

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE
PROF. DR. FERDINAND HOFSTÄDTER
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DIE ROLLE DES MDM2-SNP309 BEIM SPORADISCHEN
NIERENZELLKARZINOM**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Antonia Sophie Wenners

2010

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE
PROF. DR. FERDINAND HOFSTÄDTER
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DIE ROLLE DES MDM2-SNP309 BEIM SPORADISCHEN
NIERENZELLKARZINOM**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Antonia Sophie Wenners

2010

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Arndt Hartmann

2. Berichterstatter:

PD Dr. Maximilian Burger

Tag der mündlichen Prüfung:

15.03.2010

Inhaltsverzeichnis

<u>1 Einleitung</u>	1
1.1 Das Nierenzellkarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie	1
1.1.3 Pathologie des Nierenzellkarzinoms	3
1.1.3.1 Die Subtypen	3
1.1.3.2 Grading	6
1.1.3.3 Staging	6
1.1.4 Klinik und Diagnostik	8
1.1.5 Therapie	8
1.1.6 Prognose und Überleben	9
1.2 Molekulare Pathogenese	10
1.2.1 Krebs als molekulargenetische Erkrankung	10
1.2.2 Der Tumorsuppressor p53	12
1.2.3 MDM2 und seine Interaktion mit p53	14
1.2.4 Der Einzelnukleotid-Polymorphismus in der Krebsforschung	15
1.2.5 Der Einzelnukleotid-Polymorphismus MDM2-SNP309	16
1.2.6 Fragestellung und Zielsetzung	18
<u>2 Material</u>	19
2.1 Laborgeräte und Materialien	19
2.2 Chemikalien, Puffer, Lösungen und Enzyme	20
2.3 Verwendete Oligonukleotide (<i>Primer</i>)	22
2.4 Patientendaten	22
<u>3 Methoden</u>	25
3.1 Gewinnung von DNA	25
3.1.1 Verarbeitung eines Präparates zum Paraffinschnitt	25
3.1.2 Entparaffinieren der Paraffinschnitte	25
3.1.3 Zuhilfenahme einer HE-Färbung als Referenzschnitt	26
3.1.4 Durchführung der Mikrodisektion	27
3.1.5 Proteinase-K-Verdau und DNA-Präparation	28

3.2 Amplifizierung der DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion.....	29
3.2.1 Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion	29
3.2.2 Die Polymerase-Kettenreaktion in der MDM2-SNP309-RFLP-Analyse	30
3.3 MDM2/MSPA1I - Verdau	32
3.3.1 Prinzip des Restriktionsverdaus PCR-amplifizierter DNA	32
3.3.2 Restriktionsverdau in der MDM2-SNP309-RFLP-Analyse	33
3.4. Agarose-Gelelektrophorese	34
3.4.1 Prinzip der Gelelektrophorese	34
3.4.2 Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese	35
3.4.3 Auswertung der Gelfotographien	35
3.5 Fragmentanalyse.....	36
3.5.1 Funktionsweise des ABI Prism® 3100 and 3100-Avant Genetic Analyzer	36
3.5.2 Durchführung und Auswertung der Fragmentanalyse	38
3.6 Statistische Auswertung	41
 <u>4 Ergebnisse</u>	 42
4.1 Einleitung.....	42
4.2 Verteilung der SNP309-Genotypen nach histopathologischen Kriterien...	43
4.3 Verteilung der SNP309-Genotypen auf die Subtypen	49
4.4 Einfluss der SNP309-Genotypen auf das Überleben	50
4.5 Verteilung der SNP309-Genotypen auf die Geschlechter.....	52
4.6 Verteilung der SNP309-Genotypen auf verschiedene Altersgruppen	53
4.7 Vergleich mit der Kontrollgruppe	57
4.8 Fazit.....	59
 <u>5 Diskussion</u>	 61
5.1 Diskussion der Ergebnisse und ihre Einordnung in die aktuelle Literatur	61
5.2 Verifizierung der Ergebnisse.....	66
5.3 Vergleich mit anderen Tumorerkrankungen	69
5.4 Einordnung des SNP309 in den Gesamtkontext	70
5.5 Ausblick	74
 <u>6 Zusammenfassung.....</u>	 76

<u>7 Literaturverzeichnis</u>	78
<u>8 Anhang</u>	88
8.1 Abkürzungsverzeichnis	88
8.2 Danksagung	90
8.3 Lebenslauf	91

1 Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Nierenzellkarzinom (NZK) ist ein maligner Tumor, der vom renalen Tubulusepithel ausgeht. Mit 90 % ist es die häufigste maligne Erkrankung der Niere (Eble et al., 2004). Der Anteil an allen neu auftretenden soliden Tumoren weltweit liegt bei 2 %, womit das NZK ein eher seltener Tumor ist. Es ist der zwölft häufigste Tumor des Mannes und steht bei der Frau an 17. Stelle. Männer sind zwei- bis dreimal häufiger betroffen als Frauen (Eble et al., 2004).

Die jährliche Inzidenz des NZK in Europa beträgt 42.000 (Campbell et al., 2003). In den USA traten im Jahr 2006 38.890 NZK-Fälle auf (Jemal et al., 2006). Das NZK kommt am häufigsten in Nordamerika und Skandinavien vor, während die Inzidenz in Asien und Afrika eher niedrig ist (Laber, 2006). In den letzten drei Jahrzehnten ist die Inzidenz des NZK in beiden Geschlechtern deutlich gestiegen, was vor allem auf die verbesserte Bildgebung in der Diagnostik zurückgeführt wird (Mathew et al., 2002). Ätiologische Faktoren spielen aber sicherlich auch eine Rolle. In den USA haben einige Arbeitsgruppen die Inzidenz des NZK in verschiedenen Bevölkerungsgruppen und bei Personen unterschiedlicher ethnischer Herkunft untersucht (Kosary et al., 1993; Chow et al., 1999; Vaishampayan et al., 2003). Insgesamt lässt sich feststellen, dass der genetische Hintergrund beim NZK offensichtlich eine gewisse Rolle spielt.

Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 67, für Frauen bei nahezu 71 Jahren (Robert Koch-Institut, 2008). 80 % aller Fälle werden zwischen dem 40. und dem 69. Lebensjahr diagnostiziert, es sind jedoch auch Fälle von NZK bei Neugeborenen bekannt (Störkel, 1999).

1.1.2 Ätiologie

Die Ursache des Nierenzellkarzinoms ist größtenteils noch unklar. Trotzdem konnten bereits einige Risikogruppen identifiziert und verschiedene erworbene Risikofaktoren mit der steigenden Inzidenz dieser Erkrankung in Verbindung gebracht werden (Tab.

1). Tabakrauchen und Fettleibigkeit gelten als die bedeutendsten Risikofaktoren (Lipworth et al., 2006).

Risikofaktoren	Protektive Faktoren
<ul style="list-style-type: none"> - Rauchen - Übergewicht - Hypertonus - Karzinogene - Östrogene - Nieren-Transplantation - Dialyse - Bestrahlung 	<ul style="list-style-type: none"> - Kontrazeptiva - Obst und Gemüse - Körperliche Bewegung - Tee

Tab. 1: Risikofaktoren und protektive Faktoren des Nierenzellkarzinoms

- Rauchen: Männliche Zigarettenraucher haben gegenüber der Normalbevölkerung ein um 40 % erhöhtes Risiko, am NZK zu erkranken, bei Frauen liegt dies etwas niedriger (Eble et al., 2004).
- Adipositas: Die NZK-Inzidenz steigt mit zunehmendem Body mass index (BMI) in beiden Geschlechtern und verdoppelt sich gegenüber Normalgewichtigen bei einem BMI > 29 kg/m² (Eble et al., 2004). Die WHO schreibt einem Viertel aller Nierenzellkarzinome die Ursache Adipositas zu, verschiedene Studien sprechen sogar von 30-40 % (Bergstrom et al., 2001; Calle et al., 2004). Die erhöhte Prävalenz von Übergewichtigkeit könnte zumindest teilweise die steigende Inzidenz des NZK erklären.
- Genetische Risikofaktoren: Verschiedene Arbeitsgruppen beschreiben ein erhöhtes NZK-Risiko, wenn Verwandte ersten Grades vom NZK betroffen sind. Innerhalb dieser Gruppe ist das Risiko höher, wenn der Erkrankte ein Geschwister ist und nicht im Eltern- oder Kindverhältnis steht (Negri et al., 2006; Gago-Dominguez et al., 2001; Laber 2006). Andere dagegen wie Kreiger et al. (1993) bestreiten diesen Zusammenhang.

Neben dieser Form der Risikovererbung ohne genetische Grunderkrankung gibt es auch erbliche Erkrankungen, die mit einem erhöhten Risiko für NZK assoziiert sind. Dies sind zum Beispiel das familiäre hellzellige NZK, das erbliche papilläre NZK und das Birt-Hogg-Syndrom (Laber, 2006). Von

besonderer Bedeutung ist das Von-Hippel-Lindau-Syndrom (VHL). Es handelt sich um eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung im VHL-Tumorsuppressorgen auf dem Chromosom 3p, die zu einer Prädisposition für Tumoren in Kleinhirn, Retina, Innenohr, Pankreas, Nebennieren und Nieren führt. Ein Drittel der VHL-Patienten entwickelt ein hellzelliges NZK (Poston et al., 1995).

1.1.3 Pathologie des Nierenzellkarzinoms

1.1.3.1 Die Subtypen

Die pathomorphologische Erstbeschreibung von Nierentumoren erfolgte im Jahr 1883 durch Grawitz (Störkel, 1999). Das Nierenzellkarzinom ist ein Tumor des renalen Kortex mit mehreren Subtypen, die sich nicht nur histologisch, sondern auch zytogenetisch voneinander unterscheiden (Tab. 2) und unterschiedliche Prognosen aufweisen (siehe Kapitel 1.1.6).

Subtyp	Häufigkeit	Genetische Aberrationen	Ursprung
Hellzelliges NZK	70-80 %	3p-Verlust; Trisomie 5q	Proximale Tubuluszelle
Papilläres NZK	10-15 %	Trisomie 7, 17; Y-Verlust	Proximale Tubuluszelle
Chromophobes NZK	5 %	Y-, 1-, 2-, 6-, 10-, 21-Verluste u.a.	B-Schaltzelle des Sammelrohres
Sammelgang- karzinom	< 1 %		Hauptzelle des Sammelrohrs
Spindelzelliges NZK	1 %		Evtl. Zelle der Henleschleife
Onkozytom	5 %	Y-, 1-Verlust, Translokationen	A-Schaltzelle des Sammelrohres

Tab. 2: Übersicht über die wichtigsten Subtypen des Nierenzellkarzinoms und das Onkozytom. Häufigkeit, Zytogenetik und Histiogenese von Nierentumoren nach Literaturangaben (Eble et al., 2004; Störkel, 1999; Furge et al., 2004; Furge et al., 2007)

Der mit Abstand am häufigsten vorkommende Tumor (70-80 %) der Niere ist das hellzellige NZK, das vom proximalen Tubulus ausgeht. Historisch wird es auch als Grawitz-Tumor oder Hypernephrom bezeichnet (Cheville et al., 2003). Während der histologischen Aufarbeitung der Tumoren lösen sich die Lipide und das zytoplasmatische Glykogen auf, so dass die Zellen „hell“ oder „klar“ erscheinen (Abb. 1 A). Oftmals treten Zysten, Nekrosen, Hämorrhagien und Kalzifikationen auf. Zytogenetisch liegen häufig somatische Mutationen im Von-Hippel-Lindau-Gen (VHL) vor (Eble et al., 2004).

Das Nierenzellkarzinom vom papillären (= chromophilen) Typ stellt mit 10-15 % das zweithäufigste NZK dar. Charakteristisch ist die Anordnung der malignen epithelialen Zellen zu tubulären oder papillären Formen (Abb. 1 B; Delahunt et al., 2001).

Der dritte Haupttyp (5 %) ist das chromophobe NZK, das seinen Ursprung in den B-Schaltzellen des Verbindungsstücks bzw. Sammelrohrs hat (Störkel et al., 1989). (Abb. 1 C). Die ausgeprägte Positivität (Blaufärbung) in der kolloidalen Eisenreaktion nach Hale ist ein Schlüsselkriterium zur Diagnose.

Das hoch aggressive Karzinom des renalen Sammelrohres (Duct-Bellini-Typ; Abb. 1 D) und das spindelzellige Nierenzellkarzinom kommen nur selten (< 1 %) vor (Eble et al., 2004). Das Onkozytom ist eine benigne Neoplasie des renalen Epithels (Abb. 1 E). Ca. 5 % der Nierenzellkarzinome sind schlecht differenziert und lassen sich keinem der bekannten Subtypen zuordnen. Diese Tumoren beinhalten zumeist sarkomatoide Anteile ohne erkennbare epitheliale Strukturen (Cheville et al., 2003).

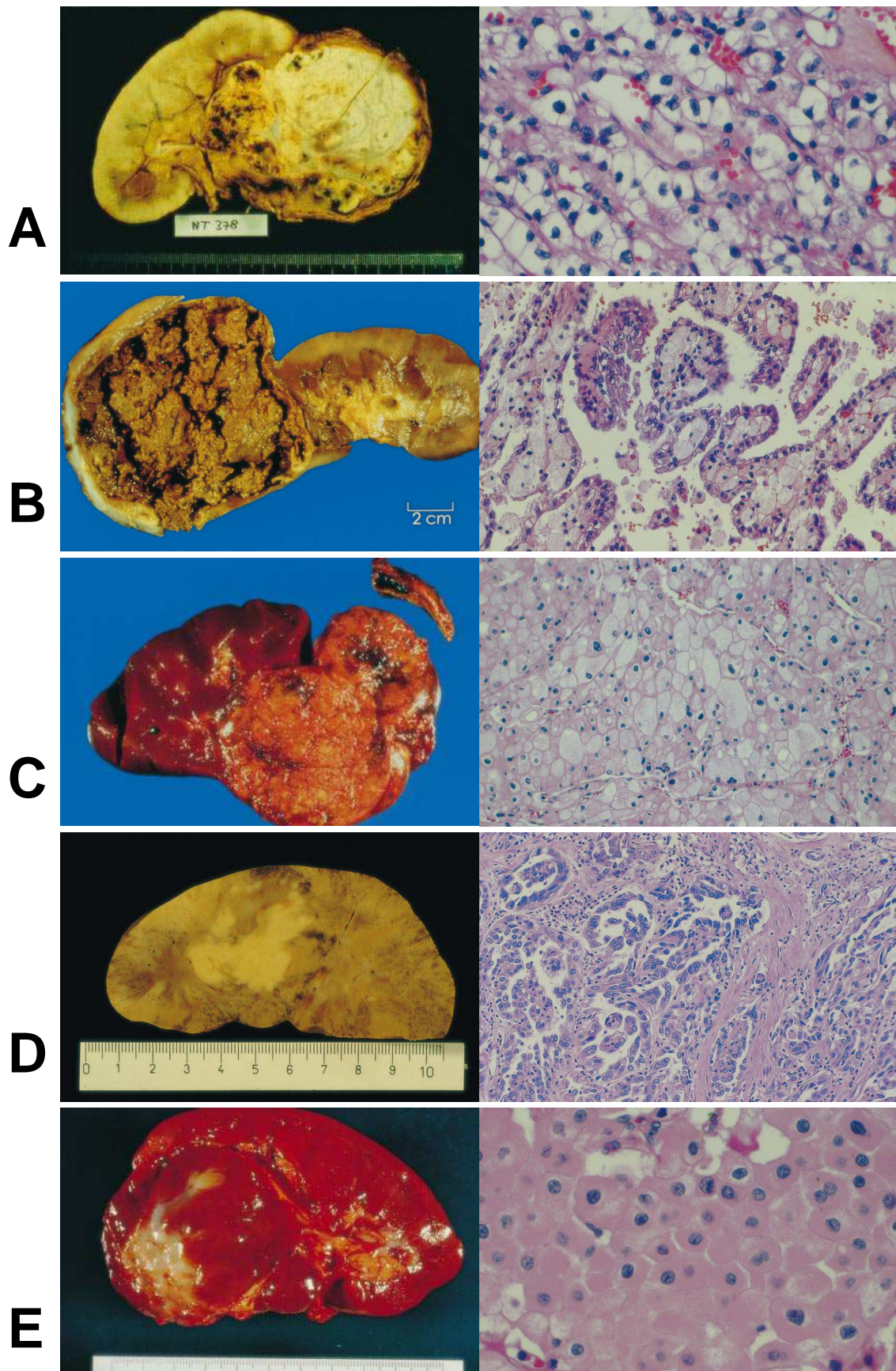


Abb. 1: Makroskopische und Mikroskopische Abbildungen der verschiedenen Nierentumoren. **A** Hellzelliges NZK; **B** Papilläres NZK; **C** Chromphobes NZK; **D** Sammelrohrkarzinom; **E** Onkozytom (aus Störkel, 1999)

1.1.3.2 Grading

Das *Grading* beim NZK erfolgt nach dem UICC- und dem Fuhrmann-System (Tab. 3). Das *Grading* ist als unabhängiger prognostischer Parameter von Interesse (siehe Kapitel 1.1.6).

Differenzierungsgrad	UICC-Definition	Fuhrmann-Definition
G I	Gut differenziert	Regelmäßige runde Kerne von der Größe normaler Tubuluszellen; kleine, nicht vergrößerte Nukleoli; fast keine Mitosen
G II	Mäßig differenziert	Anisonukleose, Kernhyperchromasie, vergrößerte Nukleoli; mehrkernige Zellen; vereinzelt Mitosen
G III / IV	Schlecht differenziert/undifferenziert	Ausgeprägte Kernpolymorphie, stark vergrößerte Nukleoli; Tumorriesenzenellen; häufig atypische Mitosen

Tab. 3: Das *Grading* des Nierenzellkarzinoms (nach Pomer, 1997; Wittekind et al., 2002)

1.1.3.3 Staging

Eine wichtige Anwendung von *Staging*-Systemen besteht in der Prognoseeinschätzung (siehe Kapitel 1.1.6) und der Planung der angemessenen Therapie einer Tumorerkrankung (Ficarra et al., 2007). Das *Tumour, Node and Metastasis* (TNM) *Staging System* wurde von der „*Union internationale contre le cancer*“ (UICC) und dem *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) vorgeschlagen und 1985 erstmals angewandt (Bassil et al., 1985). Es stellt eine dynamische *Staging*-Methode dar, die kontinuierlich überarbeitet und nach neuesten Erkenntnissen aus klinischen Studien aktualisiert wird (Gospodarowicz et al., 2004). Die letzte Revision für das NZK fand im Jahr 2002 statt (Tab. 4.; Tab. 5), so dass derzeit mit der 6. Auflage gearbeitet wird (Knight et al., 2007). Für eine nächste Auflage des TNM-Systems werden bereits einige Änderungen diskutiert und in klinischen Studien untersucht.

Die T-Kategorie gibt Auskunft über den Primärtumor. Tumorgroße, Infiltration des perirenal Fettgewebes und Veneninvasion sind die wesentlichen prognostischen

Parameter, die präoperativ und am histologischen Präparat reproduzierbar die T-Kategorie bestimmen. Bezüglich der Lymphknotenmetastasen unterscheidet die aktuelle TNM-Klassifikation zwischen einem (N1) und mehreren (N2) befallenen Lymphknoten (N-Kategorie). Die M-Kategorie beschreibt die Fernmetastasierung. Am häufigsten finden sich Metastasen in der Lunge (55 %), gefolgt von Leber (33 %), Knochen (32 %), und Gehirn (5 %) (AWMF-Leitlinien, 2003).

Lokale Ausbreitung des Primärtumors

TX	Tumor nicht beurteilbar
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor ≤ 7 cm in der größten Ausdehnung, auf die Niere beschränkt
a	Tumor ≤ 4 cm
b	Tumor > 4 cm, aber ≤ 7 cm
T2	Tumor > 7 cm, auf die Niere beschränkt
T3	Tumorinfiltration in V. renalis oder V. cava oder Nebennierenbefall oder Befall von perirenalem Gewebe, aber intakte Gerota-Faszie
a	Tumor infiltriert Nebenniere oder perirenales Gewebe, aber intakte Gerota-Faszie
b	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in V. renalis oder V. cava oder deren Wand unterhalb des Zwerchfells
c	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in V. cava oberhalb des Zwerchfells
T4	Tumor infiltriert über die Gerotafaszie hinaus

Regionäre Lymphknoten

NX	Regionären Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionären Lymphknoten-Metastasen
N1	Metastase in einem regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten

Fernmetastasen

MX	Vorliegen von Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	Keine Fernmetasten
M1	Fernmetasten

Tab. 4: TNM-Klassifikation, 6. Auflage, 2002 (nach Eble et al, 2004; Knight et al., 2007)

Stadium	T-Kategorie	N-Kategorie	M-Kategorie
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3 T1, T2, T3	N0 N1	M0 M0
IV	T4 jedes T jedes T	N0, N1 N2 jedes N	M0 M0 M1

Tab. 5: UICC-Stadien (nach Eble et al, 2004; Knight et al., 2007)

1.1.4 Klinik und Diagnostik

Bei der Diagnose des NZK dominieren Zufallsbefunde, die im Rahmen der Sonographie des Oberbauchs bei symptomlosen Patienten erhoben werden (Godley, 2000). Die typische Symptomtrias des NZK aus Hämaturie, Flankenschmerz und palpabler Tumormasse tritt nur noch selten auf, da durch die stetig besser werdende Diagnosetechnik immer mehr Tumoren auch in frühen Stadien nachgewiesen werden können. Systemische Symptome wie Gewichtsverlust, Anorexie, Fieber, Nachtschweiß und Hypertonus sind möglich. Das NZK kann ein paraneoplastisches Syndrom mit Hyperkalzämie oder normozytärer Anämie induziert. In etwa 30 % der Fälle werden die ersten Symptome durch Metastasen verursacht (Eble et al., 2004). Die Sonographie ist mit einer Sensitivität von bis zu 95 % die führende Untersuchung zur Früherkennung von Nierentumoren. Die Computertomographie gilt heute als Verfahren der Wahl zur Tumorcharakterisierung, zum präoperativen Staging und zur Nachsorge beim NZK (Drucker, 2005). Eine spezifische Vorsorge für das Nierenzellkarzinom existiert nicht.

1.1.5 Therapie

Die einzig kurative Therapieoption beim NZK stellt die chirurgische Entfernung des lokalisierten Tumors dar. Als Goldstandard gilt die radikale Nephrektomie (Lee et al., 2002). In den letzten Jahren nahmen auch weniger invasive Methoden wie die laparoskopische Nephrektomie immer mehr zu (El Galley, 2003). Bislang zeigten adjuvante Therapien kaum Erfolg; weder beim lokalisierten noch beim fortgeschrittenen NZK schlagen Radio- oder Chemotherapie an (Amato et al., 2000;

Drucker et al., 2005). Auch Die Gabe von Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- α kann nur mit einem geringfügig verlängerten Überleben in Verbindung gebracht werden (Wirth, 1993). Mit zunehmendem Wissen über die zugrunde liegenden Pathomechanismen ergeben sich neue Therapieoptionen für das metastasierte NZK. Ein therapeutischer Ansatzpunkt ist beispielsweise der Eingriff in die Tumor-Angiogenese mit Bevacizumab, einem rekombinanten monoklonalen Antikörper gegen VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) (Yang et al., 2003). Eine Verlängerung des Überlebens wird ebenfalls durch den Einsatz von Tyrosinkinaserzeptor-Inhibitoren wie Sunitinib oder durch Temsirolimus, einem m-TOR-Inhibitor (mammalian target of rapamycin) beobachtet (Escudier, 2008).

1.1.6 Prognose und Überleben

Mit 95.000 Todesfällen weltweit steht das NZK an sechster Stelle der zum Tode führenden Tumoren (Vogelzang et al., 1998). Das 5-Jahres-Überleben ist in den letzten Jahrzehnten deutlich angestiegen; von 40 % im Jahr 1960 auf 64 % im Jahr 2002 (Jemal et al., 2006). Es besteht allerdings eine gravierende Differenz im Überleben von Patienten mit lokalisiertem und metastasiertem NZK (Abb. 2).

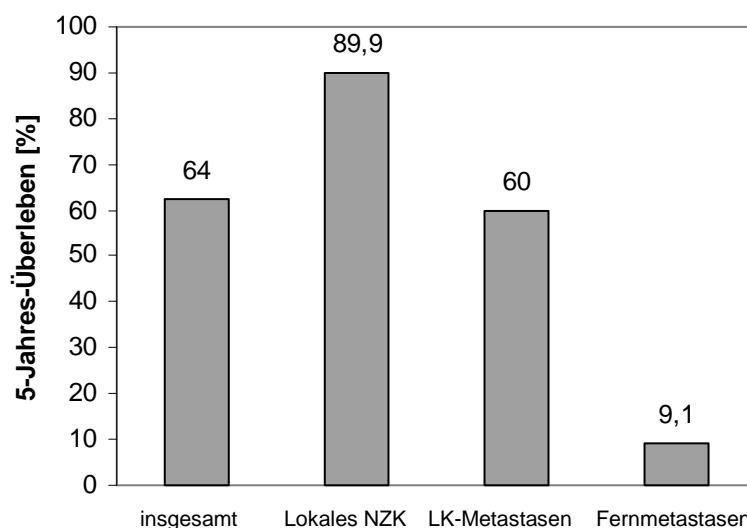


Abb. 2: 5-Jahres-Überleben nach Metastasenstatus (nach Drucker et al., 2005; Jemal et al., 2006)

Die TNM-Klassifikation stellt einen der wichtigsten prognostischen Faktoren für das NZK dar (Tab. 6). Ebenfalls prognostischen Wert hat der Grad der Differenzierung (Tab. 7).

Wie bei vielen malignen Erkrankungen spielen auch beim NZK klinische Faktoren eine wichtige Rolle in der Prognoseeinschätzung. Studien haben gezeigt, dass asymptomatische Tumoren eine bessere Prognose haben als symptomatische (Sorbellini et al., 2005). Der *Performance*-Status, ein Maß für den Allgemeinzustand, hat also wichtigen Einfluss auf das Überleben des Patienten. Er wird meist nach den Kriterien der *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) bemessen (Tsui et al., 2000).

TNM-Klassifikation	5-Jahres-Überleben
T1a	97 %
T1b	87 %
T2	71 %
T3a	53 %
T3b	44 %
T3c	37 %
T4	20 %

Tab. 6: Das 5-Jahres-Überleben bezogen auf die TNM-Klassifikation (nach Frank et al., 2005)

Differenzierungsgrad (<i>grading</i>)	5-Jahres-Überleben
1	89 %
2	65 %
3	46 %
4	46 %

Tab. 7: Das 5-Jahres-Überleben nach dem Differenzierungsgrad (nach Tsiu et al., 2000)

1.2 Molekulare Pathogenese

1.2.1 Krebs als molekulargenetische Erkrankung

Der Nachweis von somatischen Mutationen in verschiedenen wachstumsregulierenden Genen in fast allen Tumortypen sowie die Aufklärung der molekularen Grundlagen einiger erblicher Krebs syndrome haben dazu geführt, dass Krebs heute überwiegend als genetische Erkrankung mit einer Akkumulation somatischer Mutationen angesehen wird.

Die Kanzerogenese nach diesem Modell kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen (Abb. 3). Mutationen regulatorischer Gene liegen entweder in der Gruppe der wachstumsfördernden Onkogene oder der wachstumshemmenden Tumorsuppressorgene (TSG) vor. Onkogene kodieren in einer normalen Zelle überwiegend für Transmitter, Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren und sind so unmittelbar an der Proliferation und Differenzierung einer Zelle beteiligt. Mutationen können zu einer übermäßigen Aktivierung von Onkogenen führen, die eine unreguliert erhöhte Proliferationsrate oder Differenzierungsänderung bewirkt. Die TSG wirken einem unkontrollierten klonalen Zellwachstum entgegen. Sie kodieren häufig für Transkriptionsfaktoren und regulieren so z.B. in Genaktivierungskaskaden die Expression anderer Gene. Ihr Wirkmechanismus bei der malignen Transformation liegt in dem mutationsbedingten Verlust ihrer supprimierenden Funktion (Poremba et al., 1996).

Im Gegensatz zu Onkogenen, bei denen die Mutation eines Allels zur Tumorentstehung ausreicht, ist die transformierende Wirkung der TSG erst ausgebildet, wenn beide Allele einer Zelle geschädigt sind und kein ausreichend funktionsfähiges Protein mehr zur Verfügung steht. Diesen Mechanismus beschreibt die *Two-Hit*-Hypothese von Knudson (1971). Anhand des Retinoblastoms postulierte er, dass ein Allel einen durch Keimbahnmutation vererbten oder früh erworbenen Gendefekt aufweist („*first hit*“) und das zweite Allel im Laufe des Lebens durch somatische genetische Veränderungen verloren geht („*second hit*“). Solche Alterationen können durch exogene oder endogene Einflüsse und vor allem durch strukturelle Mutationen, wie z.B. Deletion, Punktmutation, Genkonversion usw. erfolgen (Abb. 3).

TSG haben auch eine Funktion im Erkennen und Reparieren von DNA-Schäden und Replikationsfehlern. Ein Verlust dieser Gene geht daher oft mit chromosomaler Instabilität (CIN) oder Mikrosatelliteninstabilität (MSI) einher (Cahill et al., 1998). Genetische Schäden können somit in der Zelle akkumulieren, was mit einer Progression der Tumorerkrankung verbunden sein kann.

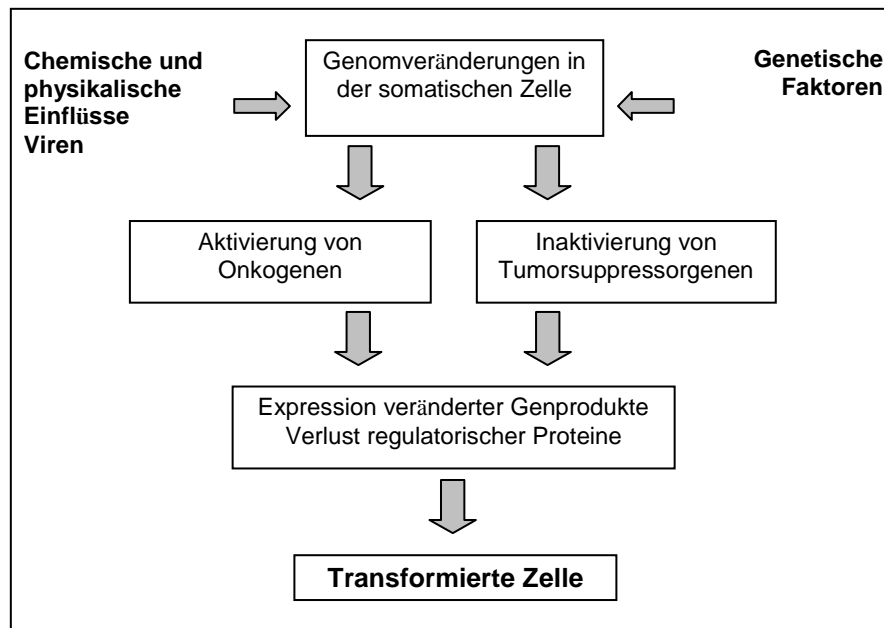


Abb. 3: Zwei Wege der Karzinogenese (nach Poremba et al., 1996)

1.2.2 Der Tumorsuppressor p53

Das p53-Gen befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (17p13). Es ist eines der meist untersuchten TSG und kodiert für ein Kernprotein, das die Aufgabe eines Transkriptionsfaktors hat (Poremba et al., 1996). P53 ist neben der Transkription an vielen weiteren zentralen zellulären Prozessen wie DNA-Reparatur, genomische Stabilität, Zellalterung, Zell-Zyklus-Kontrolle und Apoptose beteiligt (Harris, 1996).

Bei DNA-Schaden setzt p53 als Schlüsselprotein eine Genaktivierungskaskade in Gang (Abb. 4). Zunächst kommt es zu einem Zell-Zyklus-Arrest in der G1/G0-Phase. Durch Bindung an das *Wildtype-Activated-Factor1-Gen* (WAF1) aktiviert p53 die Transkription des p21-Proteins, welches über Hemmung zyklinabhängiger Kinasen die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Gens verhindert. Dadurch wird der Eintritt der Zelle in die DNA-Synthese-Phase aufgehalten und eine DNA-Reparatur kann stattfinden (Poremba et al., 1996). Zu diesem Zweck induziert p53 die Transkription des *Growth-arrest-DNA-damage-inducible-gene*-Protein (GADD-45). Ist der Schaden in der betroffenen Zelle zu groß, leitet p53 die Apoptose ein, um die Weitergabe von mutiertem, möglicherweise onkogenem Genmaterial auf Tochterzellen zu verhindern (Harris, 1996). Dieser Schutzfunktion für das menschliche Genom hat p53 den Namen „Wächter des Genoms“ zu verdanken (Lane, 1992).

In etwa 50 % aller malignen menschlichen Tumoren liegt eine Funktionseinschränkung oder sogar ein Funktionsverlust von p53 vor. Veränderungen können sowohl auf der Proteinebene des p53-Moleküls als auch auf der molekularen genomischen Ebene gefunden werden (Poremba et al., 1996). Für die Niere wurde in großen Studien in etwa einem Drittel aller Tumoren eine deutlich gesteigerte Expression von p53 nachgewiesen, was ein typischer Indikator für p53-Mutationen ist (Haitel et al., 2000; Zigeuner et al., 2004). Andere Studien wiederum bezweifelten und widerlegten häufige p53-Mutationen beim NZK (Tomasino et al., 1994; Hofmockel et al., 1996; Sejima et al., 1999).

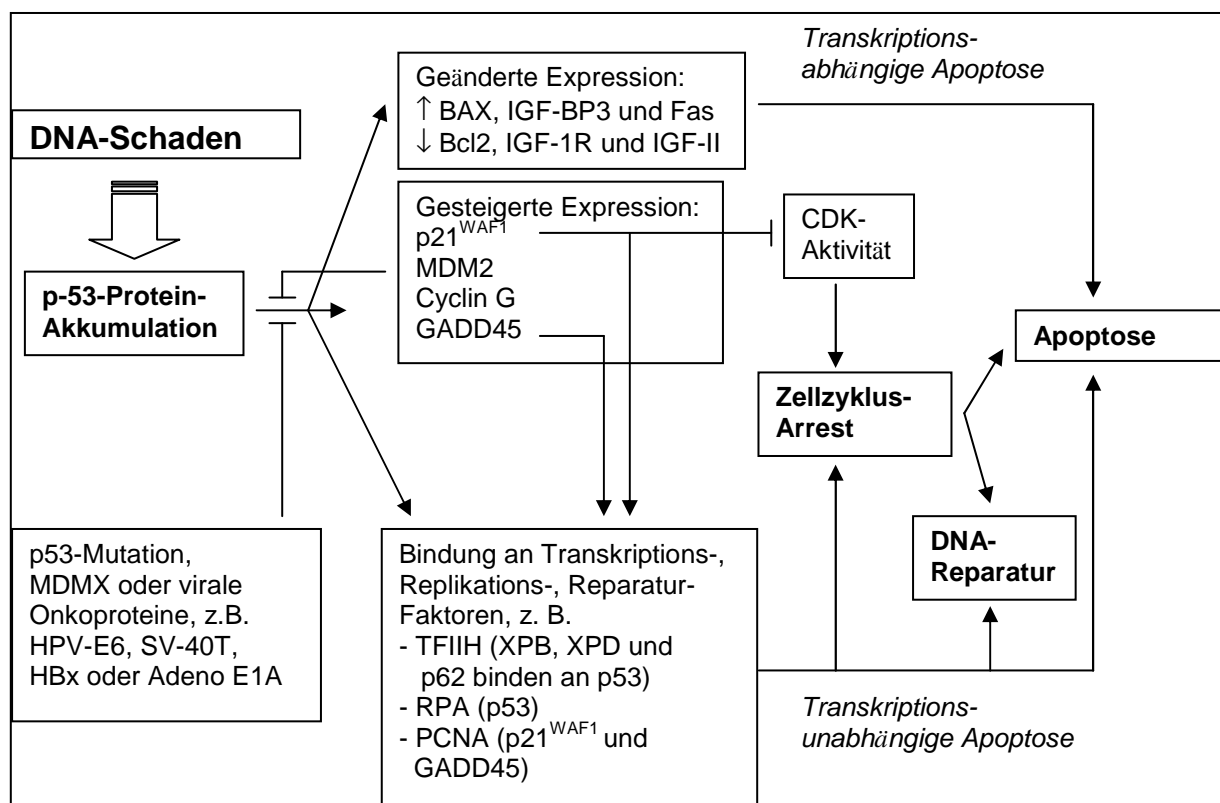


Abb. 4: Funktion von p53 beim Auftreten eines DNA-Schadens in Bezug auf Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur und Apoptose; GADD = *Growth Arrest and DNA Damage Factor*, PCNA = *Proliferating Cell Nuclear Antigen*, RPA = *Replicating Protein Antigen*, XPD = *DNA Helicase*, XPB = *Xeroderma pigmentosum Group B DNA Helicase*, TFIIH = *Transcription Factor Complex IIH*, MDMX = *X Homologue of Murine Double Minute Gene*, MDM2 = *Multiple Double Minute Protein*, HPV-E6 = *Human Papillomavirus Protein E6*, SV 40T = *Simian Virus-40 Large T Antigen*, HBx = *Hepatitis B Viral X Protein*, Adeno E1A = *Adenovirus Protein E1A* (nach Harris, 1996).

1.2.3 MDM2 und seine Interaktion mit p53

Das *mouse double minutes 2*-Protein (MDM2) ist eine p53-spezifische E3-Ubiquitin-Ligase und der zelluläre Hauptantagonist von p53. Seine Aufgabe ist die Limitierung der wachstumssupprimierenden Funktion von p53 in normalen, ungeschädigten Zellen. Das MDM2-Gen liegt auf double-minute-Chromosomen (Moll et al., 2003) und besitzt zwei Promotorregionen. Durch die erste wird der basale Spiegel von MDM2-Proteinen in der Zelle reguliert, der zweite Promotor enthält AP1-Ets und eine p53-responsive DNA-Sequenz (Ries et al., 2000). Nach Bindung des aktivierten p53 kommt es zu einem Anstieg von MDM2-Molekülen in der Zelle. Diese binden wiederum an das p53-Protein und blockieren seine Transkriptionsfunktion. Außerdem sorgt MDM2 für die Ubiquitinierung sowie den Export von p53 aus dem Zellkern ins Zytoplasma. Hier sichert eine Polyubiquitinierung den schnellen p53-Abbau in zytoplasmatischen Proteasomen. Es besteht also ein negativer Rückkopplungsmechanismus, denn eine durch p53 induzierte gesteigerte Expression von MDM2 führt zu einer Hemmung der p53-Aktivität (Weinberg, 2007).

Besteht ein Zellschaden, muss p53 der Inaktivierung und dem Abbau durch MDM2 entgehen, damit nach Akkumulation eine ausreichend hohe Anzahl funktionsfähiger p53-Moleküle in der Zelle vorliegt. Dieser Abbauschutz wird durch Phosphorylierung erreicht. Kinasen wie z.B. Ataxia-Telangiectasia mutated (ATM) phosphorylieren sowohl p53 als auch MDM2 und verhindern somit eine Bindung der beiden Proteine mit nachfolgender p53-Ubiquitinierung (Weinberg, 2007).

In ungeschädigten Zellen dagegen ist es wichtig, dass p53 von MDM2 streng reguliert auf einem sehr niedrigen Level gehalten wird, um den Zellzyklus im Gleichgewicht zu halten. Die p53-Halbwertszeit in intakten Zellen ist daher kurz (5 - 45 min). Einen guten Überblick über die komplexen Abläufe der p53-Regulation bietet Abbildung 5. Die Expression und Aktivität von MDM2 wird neben p53 zusätzlich noch von anderen Signalen reguliert, z.B. ARF, MDM4 oder auch Hormone wie Östrogene.

1.2.4 Der Einzelnukleotid-Polymorphismus in der Krebsforschung

Die genetische Variation im menschlichen Genom ist eine immer wichtiger werdende Grundlage in der Krebsforschung. Einen Baustein in der Analyse des genetischen Einflusses auf so komplexe Erkrankungen wie Krebs stellt der Einzelnukleotid-Polymorphismus (*Single-Nucleotide Polymorphism* (SNP)) dar (Erichsen et al., 2004). SNPs sind die häufigsten Sequenzvarianten des menschlichen Genoms. Sie entstehen durch Punktmutationen und sind definiert durch eine Allel-Frequenz von mehr als 1 % in einer Population (Risch, 2000). Die meisten SNPs sind „still“, d.h., sie verändern weder Funktion noch Expression eines Gens. Insgesamt gibt es schätzungsweise 10 Millionen verschiedene SNPs im menschlichen Genom (Botstein et al., 2003), die zur Individualität eines Menschen beitragen.

Da die Analyse von SNPs teuer und aufwendig ist, wurden bisher vor allem Gene betrachtet, die für das biologische Verständnis von Bedeutung sind. Solchen Kandidatengenen können etwa 50.000 bis 250.000 SNPs zugeordnet werden (Risch, 2001). In der aktuellen Krebsforschung werden SNPs vor allem hinsichtlich ihrer Effekte auf Inzidenz, Erkrankungsalter, Prognose und Therapieansprechen untersucht (Erichsen et al., 2004).

Bevor SNP-Studien anerkannt werden können, muss allerdings die Reproduzierbarkeit ihrer Ergebnisse gesichert sein.

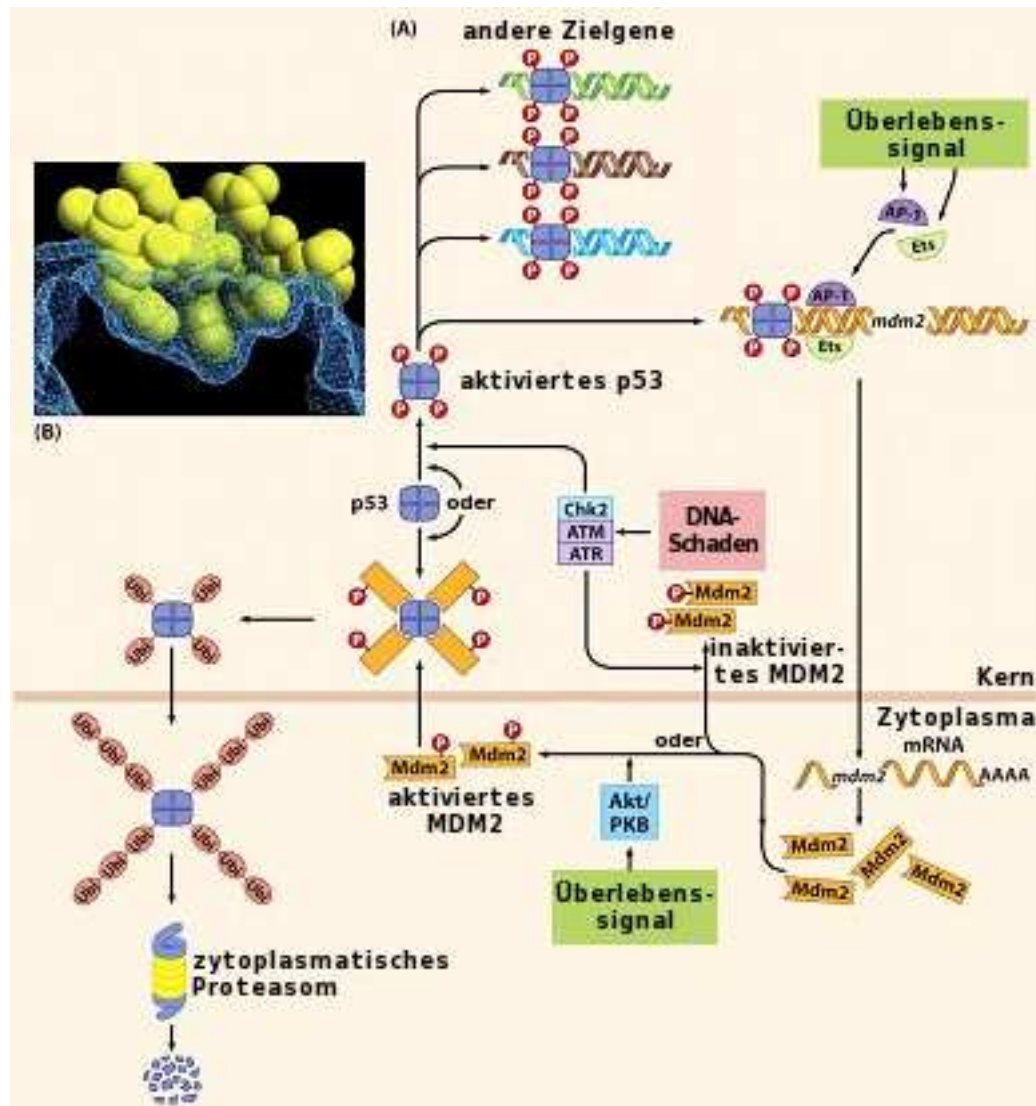


Abb. 5: **A** Die p53-Regulation; Erläuterungen siehe Text; **B** kristallographisch dargestellte Struktur der MDM2-p53-Bindungsstelle (aus Weinberg, 2007)

1.2.5 Der Einzelnukleotid-Polymorphismus MDM2-SNP309

Bond et al. (2004) entdeckten den Einzelnukleotid-Polymorphismus SNP309 im Promotor des MDM2-Gens. Es handelt sich um eine Nukleotid-Änderung vom Wildtyp Thymin zu Guanin (T → G) am 309. Nukleotid des Intron 1. Das Vorliegen des G-Allels am MDM2-SNP309 erhöht die Bindungsaffinität des Transkriptionsaktivators *stimulatory protein 1* (SP1) um ein Vierfaches gegenüber dem Wildtyp-Allel. Folge ist eine gesteigerte Expression von MDM2, die in einer abgeschwächten Effektivität des p53-Signalwegs resultiert (Bond et al., 2005).

Funktionelle Konsequenz des Vorliegens von SNP309 in einer Zelle mit Wildtyp-p53 ist also die Reduktion des p53-Levels, der p53-vermittelten Transkription von Genen und der Apoptose dieser Zellen nach Schädigung der DNA (Abb. 6).

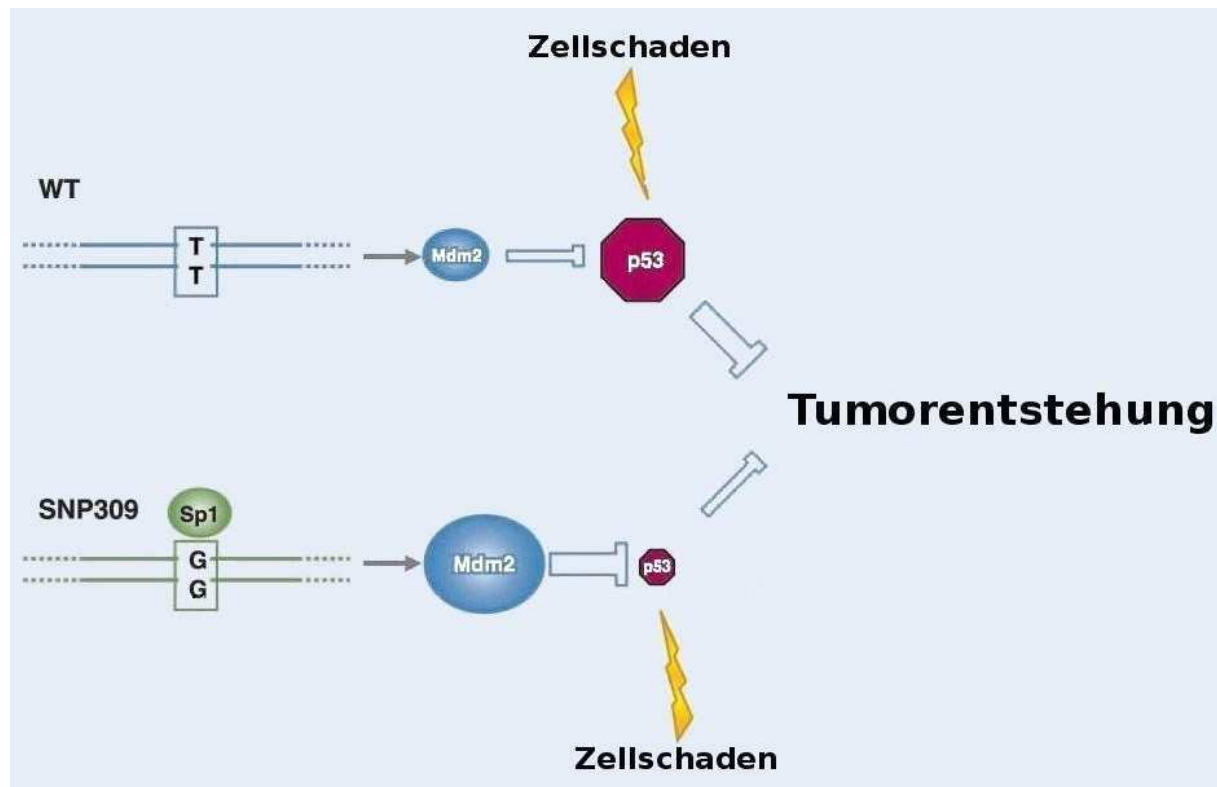


Abb. 6: Einfluss des SNP309 auf den p53-Signalweg und seine Bedeutung für die Tumorentstehung (nach Bond et al., 2005)

Es konnte nachgewiesen werden, dass der SNP309 beim Menschen mit vermehrter Tumorbildung und beschleunigtem Tumorwachstum sowohl bei erblichen als auch sporadischen Krebserkrankungen einhergeht (Bond et al., 2005; Hu et al., 2007, Hong et al., 2005; Ohmiya et al., 2006). Der SNP309 wird außerdem mit einem früheren Erkrankungsalter in Verbindung gebracht (Menin et al., 2006; Bond et al., 2004; Hu et al., 2007).

Aufgrund von Verbindungen zu Östrogensignalwegen gibt es Anlass zu der Annahme, dass das Vorliegen des SNP309 zu einem geschlechtsspezifischen und hormonabhängigen Tumorwachstum führt. Demnach wären vor allem Frauen betroffen (Bond et al., 2004; Lind et al., 2006; Alhopuro et al., 2005; Menin et al., 2006). Zudem wurde eine Korrelation zwischen erhöhter MDM2-Expression und einer schlechten Prognose nachgewiesen (Ohmiya et al., 2006).

1.2.6 Fragestellung und Zielsetzung

Kürzlich konnte demonstriert werden, dass der G/G-Genotyp des SNP309 mit einem erhöhten Lungenkrebsrisiko (Lind et al., 2006) assoziiert ist, während er bei Mamma- und Ovarialkarzinom keine Rolle spielt (Campbell et al., 2005, Millikan et al., 2006). Zurzeit liegen noch keine Daten über die Rolle des MDM2-Polymorphismus im sporadischen Nierenzellkarzinom (NZK) bei Europäern vor. Daher ist es das Ziel dieser Arbeit, die Beziehung zwischen SNP309 und dem NZK zu untersuchen.

Die genetischen Grundlagen des NZK sind mit Ausnahme des hellzelligen Subtyps schlecht untersucht. Da p53 in einem Großteil der NZK-Tumorzellen als Wildtyp vorliegt und trotzdem genetische Aberrationen bestehen, liegt die Vermutung nahe, dass ein anderer Teil des p53-Signalweges betroffen sein könnte, z.B. MDM2.

Die Klärung dieser Frage hat klinische Relevanz, da mit genauer Kenntnis über die Rolle des SNP309 bei NZK-Patienten Einfluss auf die Prävention und Früherkennung sowie auf die gezielte Therapie des NZK genommen werden kann.

2 Material

2.1 Laborgeräte und Materialien

Binokulares Lichtmikroskop (*A. Krüss Optronic, Hamburg*)

Eismaschine (*Ziegra-Eismaschinen, Isernhagen*)

Erlenmeyerkolben 250 ml, Schott Duran (*Schott, Zwiesel*)

Fotoapparatur (*Zeiss Axiophot, Göttingen*)

Gelelektrophoreseapparatur WIDE MINI-SUB® CELL GT (*BIORAD, München*)

Genetic Analyser, 3100-Avant (*Applied Biosystems, Foster City, USA*)

Glasobjektträger (*Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde*)

Laborschüttler, Thermomixer comfort (*Eppendorf AG, Hamburg*)

Magnetrührer mit Heizplatte RCT basic (IKAMAG® Safety control) (*IKA-Werke, Staufen*)

Mikrotiterplatte, 96 Wells (*Applied Biosystems, Foster City, USA*)

Mikrotom (*Microm International GmbH, Walldorf*)

Pipetten, Finnpietten (*Labsystems 4500, Quickborn*)

Pipettenspitzen SafeSeal-Tips 200 µl, 20 µl (*Biozym Diagnostics GmbH, Hess. Oldendorf*)

Pipettenspitzen SafeSeal-Tips Premium 1 ml (*Biozym Diagnostics GmbH, Hess. Oldendorf*)

Reaktionsgefäße PCR Softtubes 0,5 ml (*Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf*)

Reaktionsgefäße Safe-Lock Tubes 1,5 ml (*Eppendorf AG, Hamburg*)

Spannungsquelle Power Pac Basic (*BIORAD, München*)

Sterile Kanülen Microlance™ 3 (*Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA*)

Thermocycler Peltier Thermal Cycler PTC-100 MJ Research (*Watertown, MS, USA*)

Vortexer MS2 Minishaker (*IKA-Werke, Staufen*)

Vortexer, REAX top (*Heidolph, Schwabach*)

Waage EW 3000-2M (*Kern&Sohn, Balingen*)

Wärmeschrank (*Heraeus, Hanau*)

Wasserfilteranlage MILLIPORE (*Millipore, Eschborn*)

Zentrifuge Centrifuge 5415 D (*Eppendorf AG, Hamburg*)

Zentrifuge Centrifuge 5415 R (*Eppendorf AG, Hamburg*)

2.2 Chemikalien, Puffer, Lösungen und Enzyme

Zur Herstellung der aufgeführten Puffer und Lösungen wurde ultrafiltriertes Wasser aus der Wasserfiltrationsanlage MILLIPORE (Millipore, Eschborn, Germany) verwendet.

a) Allgemeine Lösungen

0,5 M EDTA (pH 8,0)

Ethylendiamintetraacetat (Serva, Heidelberg)	73,1 g
Wasser	800 ml
→ rühren, mit NaOH pH 8,0 einstellen, mit Wasser auf 1000 ml auffüllen	

b) Lösungen für die HE-Färbung von Paraffinschnitten

Hämatoxylin (0,5%)

Hämatoxylin-Monohydratpulver (Merck, Darmstadt)	0,5 g
Ethanol, absolut (J.T. Baker, Griesheim)	10,0 ml
→ lösen, mit 90,0 ml Wasser verdünnen, Reifezeit 4 Wochen	

Eosin (0,5%): gebrauchsfertig von Merck, Darmstadt

c) Lösungen für die DNA-Isolation aus Paraffinmaterial

Xylol: gebrauchsfertig von MERCK, Darmstadt

Ethanol (70%)

Ethanol absolut (J.T. Baker, Griesheim)	700,0 ml
Wasser	300,0 ml

Methylenblau-Lösung (0,1%)

Methylenblau-Trihydratpulver (SIGMA, München)	0,1 g
Wasser	100 ml

Proteinase K: gebrauchsfertig von MERCK, Darmstadt

High Pure PCR Template Preparation Kit: gebrauchsfertig von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

d) Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion

GoTaq: gebrauchsfertig von Promega Corporatio, Madison, USA

Colorless GoTaq Reaktion Buffer (5x): gebrauchsfertig von Promega Corporatio, Madison, USA

dNTP-Mix (10 mM)

dATP (Boehringer, Mannheim)	10 µl
dTTP (Boehringer, Mannheim)	10 µl
dCTP (Boehringer, Mannheim)	10 µl
dGTP (Boehringer, Mannheim)	10 µl
Wasser	60 µl

→ steril auf Eis pipettieren, aliquotieren, Lagerung bei -20°C

Oligonukleotide (15 µM): gebrauchsfertig von SIGMA, München

→ steril auf Eis pipettieren, aliquotieren, Lagerung bei -20°C

e) Lösungen für den Verdau

MSPA1: gebrauchsfertig von New England Biolabs, Frankfurt/Main

NEBuffer 4 (10x): gebrauchsfertig von New England Biolabs, Frankfurt/Main

BSA 10 mg/ml (100x): gebrauchsfertig von New England Biolabs, Frankfurt/Main

f) Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

TAE (50x) für 1 l

Trisaminomethan (MERCK, Darmstadt)	242,48 g
0,5 M EDTA pH 8,0	14,62 g

Agarose-Gel (2,5%)

Agarose (Invotrogen life technologies, Paisley, UK)	2,5 g
1x-TAE	ad 100ml

Stopppuffer

0,5 M EDTA (pH 8,0)	60 µl
Bromphenolblau (SIGMA, München)	0,0125 g
Ficoll, Typ 400 (SIGMA, München)	0,75 g

→ in 5 ml H₂O lösen, aliquotieren, Lagerung bei 4°C

Größenstandard 100bp Gene Ruler: gebrauchsfertig von Fermentas, St. Leon-Rot

Ethidiumbromid-Lösung (0,05%)

Ethidiumbromid (MERCK, Darmstadt)	500 µl
Wasser	1 l

g) Lösungen für die DNA-Fragmentanalyse

HIDI: gebrauchsfertig von Applied Biosystems, Foster City, USA

GS-400HD ROX Size Standard: gebrauchsfertig von Applied Biosystems, Foster City, USA

2.3 Verwendete Oligonukleotide (Primer)

Name	Ann.	Sequenz (5' → 3')	bp
MDM2SNP309a (3'→5'-Strang)	61°C	CTGAGTCAACCTGCCCCACTG	20
MDM2SNP309sFAM (5'→3'-Strang)	61°C	(6-Fam)CGCGGGAGTTCAGGGTAAAG	20

Tab. 8: Oligonukleotide; Ann. = *Annealing*-Temperatur, bp = Basenpaare

2.4 Patientendaten

In dieser Arbeit wurde das Normalgewebe von 257 überwiegend europäischen Patienten mit Nierenzellkarzinom untersucht und mit 111 Fällen einer gesunden Kontrollgruppe gleicher ethnischer Herkunft verglichen. Die Gewebeproben der Tumorpatienten wurden im Rahmen von Nephrektomien und Teilnephrektomien im Zeitraum von 1992 bis 2005 an verschiedenen Orten in Deutschland und im Ausland gewonnen (Regensburg, Deggendorf, Schwerin, Jena, Zürich, Vermont). Die Bearbeitung, Konservierung und Archivierung des Materials erfolgte am jeweiligen Institut für Pathologie und wurde dem Institut für Pathologie der Universität Regensburg für Studienzwecke zur Verfügung gestellt.

In den folgenden Tabellen werden zum vorliegenden Material nähere Angaben bezüglich der Subtypenverteilung, Tumorstadien und Differenzierungsgrade sowie zu Patientengeschlecht und -alter gemacht.

Nierenzellkarzinom-Subtypen	Anzahl (n = 257)	%
Hellzellig	101	39,3
Papillär	32	12,5
Chromophob	102	39,6
Onkozytom	5	1,9
Spindelzellig	2	0,8
Undifferenziert	4	1,6
Sammelrohrkarzinom	1	0,4
Hellzellig mit papillärem Anteil	3	1,2
Unklarer Subtyp	7	2,7

Tumorstadien	Anzahl (n = 162)	%
Stadium 1	97	59,9
Stadium 2	17	10,5
Stadium 3	31	19,1
Stadium 4	17	10,5

Tumorausbreitung	Anzahl (n = 217)	%
T1a	85	39,2
T1b	49	22,6
T2	35	16,1
T3a	27	12,4
T3b	21	9,7

Lymphknotenstatus	Anzahl (n = 179)	%
N0	169	94,4
N1	2	1,1
N2	8	4,5

Metastasen	Anzahl (n = 165)	%
M0	154	93,3
M1	11	6,7

Differenzierungsgrad	Anzahl (n = 219)	%
G1	55	25,1
G2	134	61,2
G3	29	13,2
G4	1	0,5

Resektionsrand	Anzahl (n = 165)	%
R0	159	96,4
R1	5	3,0
R2	1	0,6

Geschlecht	Anzahl (n = 223)	%
Männlich	127	57,0
Weiblich	96	43,0

Alter [Jahre]	Anzahl (n = 233)	%
< 45	66	28,3
45-74	63	27,0
≥ 75	104	44,6

Mittelwert	62,8 Jahre
Median	67,0 Jahre
Maximum	91 Jahre
Minimum	19 Jahre

Im Rahmen einer anderen Studie wurde die tumorfreie Kontrollgruppe untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie wurden in der vorliegenden Arbeit zum Vergleich herangezogen. Die Kontrollgruppe besteht aus 111 Personen (101 Männer, 10 Frauen) im Alter von 25 bis 99 Jahren. Davon litten 79 an einer benignen Prostatahyperplasie, 18 an Zystitis und 14 waren ohne nähere Angaben tumorfrei.

3 Methoden

3.1 Gewinnung von DNA

3.1.1 Verarbeitung eines Präparates zum Paraffinschnitt

Bevor ein Präparat beispielsweise in Form eines Paraffinschnittes für die Mikrodissektion und damit für die angestrebte DNA-Isolierung herangezogen werden konnte, musste es zunächst einige Arbeitsschritte durchlaufen. Im pathologischen Institut des Universitätsklinikums Regensburg wurde das Tumorpräparat nach dem Zuschnitt für einige Stunden in 4% gepufferter Formalinlösung fixiert und anschließend in Paraffinblöcke gegossen, die je nach Herkunftsort nummeriert, beschriftet und archiviert wurden.

Von diesen haltbaren Blöcken konnten nun zu jedem Zeitpunkt Paraffinschnitte angefertigt werden. Dies geschah mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (MICRO HM 400, Heidelberg), wobei die Schnittdicke nach Bedarf eingestellt werden konnte. Für die Mikrodissektion ist es üblich, mit etwa 5 µm dicken Schnitten zu arbeiten. Nach kurzem Ruhenlassen auf der Oberfläche eines 55°C warmen Wasserbads ließen sich die Gewebsschnitte problemlos auf einen zuvor mit Alkohol gereinigten, nicht beschichteten Glasobjektträger aufziehen. Dieser war ebenso wie der zugehörige Paraffinblock beschriftet. Um Schäden bei der Weiterverarbeitung des frischen Paraffinschnitts zu vermeiden, wurde er bei 42-45°C im Wärmeschrank getrocknet.

3.1.2 Entparaffinieren der Paraffinschnitte

Die Bearbeitung eines solchen Gewebeschnittes mit dem Ziel der DNA-Isolierung erforderte zunächst wieder die Entparaffinierung des Gewebes. Dazu wurden jeweils vier bis fünf auf Objektträgern befindliche getrocknete Schnitte des gleichen Blocks in einem Ständer angeordnet. Nach etwa 30-minütiger Verweildauer in einem Wärmeschrank (Heraeus, Hanau) bei 72°C war ein Großteil des Paraffins geschmolzen und vom Objektträger abgelassen. Zur kompletten Entparaffinierung wurden die Schnitte insgesamt 20 Minuten in Xylol gestellt und durchliefen anschließend eine absteigende Alkoholreihe. Dabei blieben sie nacheinander jeweils 3-5 Minuten in zwei 100%igen, zwei 96%igen und einem 70%igen Alkoholbad stehen. Falls die Mikrodissektion nicht direkt im Anschluss erfolgte, konnten die

entparaffinierten Schnitte problemlos bis zu einer Woche in 70%igem Alkohol gelagert werden.

3.1.3 Zuhilfenahme einer HE-Färbung als Referenzschnitt

Um bei der Mikrodissektion gezielt und sicher Tumorareale von Normalgewebebezirken unterscheiden und isolieren zu können, war es hilfreich, die Leerschnitte vor Arbeitsbeginn mit einem HE-Schnitt desselben Gewebeblocks zu vergleichen. Auf einem solchen 2 µm dicken, nach Standardprotokoll mit Hämatoxilin-Eosin gefärbten Schnitt (Tab. 9) ließen sich die histologischen Strukturen unter dem Lichtmikroskop gut beurteilen, so dass er als Referenzschnitt sehr gut geeignet war (Abb. 7). Die relevanten Gewebeareale wurden mit einem Folienstift auf dem Objektträger markiert.

-
- | | |
|-----|--|
| 1. | 10 min Xylol |
| 2. | Rehydrierung in absteigender
Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 60%) |
| 3. | 1 min in destilliertem Wasser |
| 4. | 10 min in Hämatoxylin |
| 5. | 25 min Bläuen in Leitungswasser (warm) |
| 6. | Wenige Sekunden in Eosin |
| 7. | Spülen in Leitungswasser (kalt, 2x) |
| 8. | Dehydrierung in aufsteigender
Alkoholreihe
(60%, 80%, 96%, 100%) |
| 9. | Xylol |
| 10. | Eindeckeln mit Entellan und Deckglas |
-

Tab. 9: Standardprotokoll einer Hämatoxilin-Eosin-Färbung

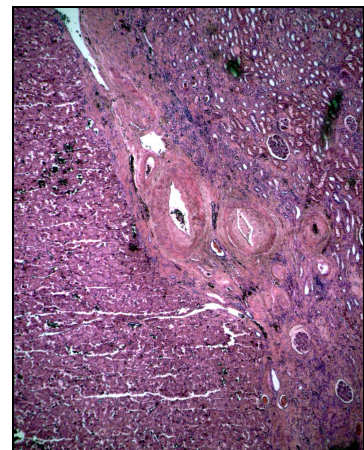


Abb. 7: HE-Referenzschnitt eines Nierenzellkarzinoms. Links der Gefäßregion befindet sich das Tumorgewebe, rechts davon Normalgewebe.

3.1.4 Durchführung der Mikrodissektion

Die entparaffinierten Leerschnitte wurden mit 0,1%iger Methylenblau-Lösung für etwa eine Minute gefärbt. In einer Küvette mit entionisiertem Wasser wurde die überschüssige Farbe anschließend durch leichtes Schwenken des Objektträgers abgewaschen. Mit dem binokularen Lichtmikroskop (A. Krüss Optronic, HH) ließen sich vor allem im Vergleich mit dem markierten HE-Referenzschnitt auf den Methylen-gefärbten Schnitten die Tumor- bzw. tumorfreien Normalgewebeareale problemlos aufsuchen (Abb. 8).

Der Gewebeschnitt trocknete recht schnell aus und das Gewebe war dann nicht mehr zufriedenstellend vom Objektträger zu lösen. Deshalb musste zügig begonnen werden, das Normalgewebe mithilfe einer sterilen Kanüle (Microlance, Franklin Lakes, USA) mit vorsichtig schabenden Bewegungen vom Objektträger zu lösen und mit der Kanüle aufzunehmen. Die Probe wurde in ein beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert, das 200 µl Verdaupuffer (Teil des *High Pure PCR Template Preparation Kits*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) enthielt. Anschließend war unter Zuhilfenahme einer neuen sterilen Kanüle und gegebenenfalls nach erneuter Befeuchtung des Schnitts mit dem Tumoreal genauso zu verfahren.

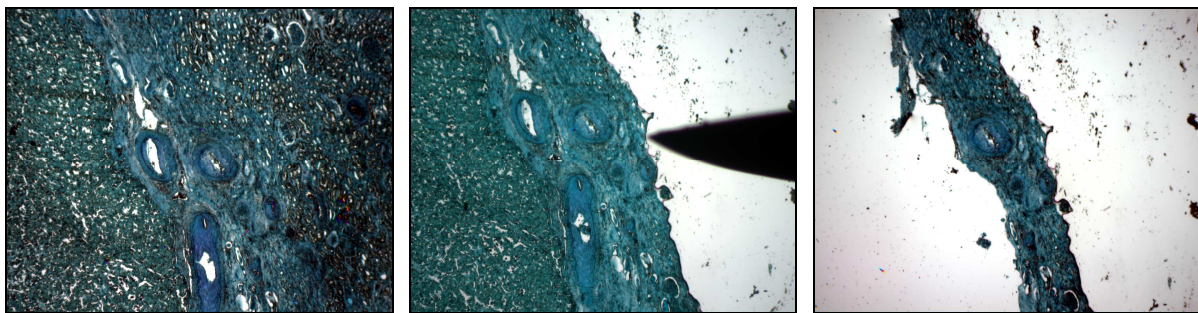


Abb. 8: Nierenzellkarzinom vor der Mikrodissektion (links), nach Entfernen des Normalgewebes (mitte) und nach zusätzlichem Abtragen des Tumorgewebes (rechts).

3.1.5 Proteinase-K-Verdau und DNA-Präparation

Aus dem Gewebe, welches sich nun in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Verdaupuffer befand, sollte im folgenden Schritt mit Hilfe des *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) reine DNA gewonnen werden. Dazu musste zunächst ein vollständiger Verdau aller Proteinstrukturen der Gewebeprobe stattfinden, z.B. aller extranukleären DNAsen. Direkt nach der Mikrodisektion wurden die Tumor- und Normalgewebeproben mit 40 µl Proteinase K (MERCK, Darmstadt) versetzt, mit dem Vortexer gut durchmischt, herunterzentrifugiert und über Nacht bei 55°C und 550 rpm (*rounds per minute*) in einem Thermoblock inkubiert. Am nächsten Morgen wurden noch einmal 10 µl Proteinase K zugegeben und die Suspensionen für eine weitere Stunde bei gleichen Bedingungen nachverdaut. Anschließend erfolgte die manuelle DNA-Präparation des verdauten Materials mit dem *High Pure PCR Template Preparation Kit* wie folgt:

- Zugabe von 200 µl Bindungspuffer, mischen durch Auf- und Abpipettieren, für 10 Minuten bei 70°C inkubieren
- Zugabe 100 µl Isopropanol, mischen
- ein Filter-Säulchen in ein Reaktionsgefäß stellen, die Probe hineinpipettieren
- Zentrifugieren für eine Minute bei 8000 rpm
- ein neues Reaktionsgefäß bereitstellen und die Säulchen hineinstellen
- 500 µl Entfernungspuffer in die Säulchen pipettieren
- Zentrifugieren für eine Minute bei 8000 rpm
- ein neues Reaktionsgefäß bereitstellen und die Säulchen hineinstellen
- 500 µl Waschpuffer in die Säulchen pipettieren
- Zentrifugieren für eine Minute bei 8000 rpm
- ein zweites Mal 500 µl Waschpuffer in die Säulchen pipettieren
- Zentrifugieren für eine Minute bei 8000 rpm
- den Überstand aus den Reaktionsgefäßen verwerfen und die Säulchen mit den Reaktionsgefäßen für 10 Sekunden bei voller Geschwindigkeit trocken-zentrifugieren
- für die Proben je ein neues Reaktionsgefäß mit Deckel vorbereiten und beschriften, die Säulchen hineinstellen
- 200 µl Elutions-Puffer (auf 70°C erwärmt) zugeben, für fünf Minuten bei 70°C inkubieren, anschließend sofort zwei Minuten bei 8000 rpm zentrifugieren

Nun wurde die gereinigte DNA im beschrifteten 1,5 ml Reaktionsgefäß in Boxen geordnet bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Trotz des größeren Zeitaufwands und der erhöhten Kontaminations- und Verwechslungsgefahr bietet diese Methode einen wesentlichen Vorteil gegenüber der maschinellen Aufarbeitung der DNA. Man ist unabhängig von Maschinen und somit von deren Ausfall oder Versagen und der Lerneffekt und Verstehensgrad seiner Arbeit ist für den Doktoranden deutlich größer. Außerdem wird die präparierte DNA nach der manuellen Aufarbeitung in Puffer mit EDTA gelagert und ist somit vor dem Angriff von DNAsen geschützt, während ein Aufarbeitungsgerät häufig H₂O als Medium verwendet.

3.2 Amplifizierung der DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion

3.2.1 Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR für „*polymerase chain reaction*“) ist ein Verfahren zur Vervielfältigung einer spezifischen DNA-Sequenz in vitro. Benötigt werden ein Oligonukleotidpaar, welches die gewünschte Zielsequenz jeweils auf der 3'-Seite des Matrixstranges flankiert, eine hitzestabile DNA-Polymerase und die vier verschiedenen Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) in ausreichender Menge. Ein Zyklus einer PCR besteht aus drei Einzelschritten:

1. Auftrennung der doppelsträngigen Ausgangs-DNA in Einzelstränge durch kurzes Erhitzen (1 min) auf 94°C (Denaturierung)
2. Hybridisierung der Oligonukleotide an ihre komplementären Sequenzen (*Annealing*) bei der sogenannten *Annealing*-Temperatur, welche je nach Primer 50-70°C beträgt
3. Verlängerung der Oligonukleotide (Elongation) bei 72°C durch Anheften der komplementären Nukleotide an das freie 3'-OH-Ende und damit in Richtung Zielsequenz (Stryer et al., 2003)

Ein Wiederanlagern von zwei komplementären Strängen der Ausgangs-DNA während der Hybridisierung wird durch die hohe Konzentration an Primern verhindert. Als Polymerase wird heutzutage ein Enzym aus dem thermophilen

Bakterium „*Thermus aquaticus*“ verwendet, die sogenannte Taq-Polymerase. Der Vorteil dieses Enzyms liegt in seiner Hitzestabilität, so dass es den Denaturierungsschritt übersteht und daher nicht nach jedem Zyklus neu hinzugefügt werden muss. Seine optimale Aktivität entfaltet das Enzym bei 72°C.

Die gewünschte DNA-Sequenz wird durch die PCR exponentiell vermehrt. Im Idealfall ist die Sequenz nach n Zyklen um das 2^n -fache amplifiziert worden, meist beträgt die Vermehrung nach 20-30 Runden 10^6 bzw. 10^7 (Stryer et al., 2003). Die große Sensitivität und das exponentielle Prinzip der enzymatischen Reaktion ist einerseits ein großer Vorteil der Methode, macht sie andererseits aber auch besonders empfindlich für Kontaminationen nur geringsten Ausmaßes. Deshalb müssen sowohl bei der Probenentnahme als auch im Labor sorgfältige Vorkehrungen getroffen werden (Kulozik et al., 2000).

3.2.2 Die Polymerase-Kettenreaktion in der MDM2-SNP309-RFLP-Analyse

Die PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit dazu verwendet, einen Bereich von 157 bp in der Promotorregion des MDM2-Gens zu amplifizieren und diesen im Folgenden auf einen Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) an Position 309 (T → G) zu untersuchen. Um die Auswertung der amplifizierten DNA später mit Hilfe der Fragmentanalyse durchführen zu können, wurde zur Hybridisierung mit dem 5'→3'-Strang ein fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid gewählt. Das Oligonukleotid, das mit dem 3'→5'-Strang hybridisierte, war nicht fluoreszenzmarkiert. Sowohl 5'→3'- als auch 3'→5'-Oligonukleotid hatten eine Länge von 20 Basenpaaren und arbeiteten unter einer *Annealing*temperatur von 61°C (Tab. 8).

Zum Ansetzen einer PCR wurden sämtliche Reagenzien auf Eis pipettiert, um die Haltbarkeit der Substanzen zu erhöhen und unspezifische Reaktionen zu minimieren. Die Zusammensetzung des Standard-PCR-Ansatzes mit einem Ansatzvolumen von 25 µl lautet wie folgt (Tab. 10):

PCR-Komponenten	Endkonzentration im Master-Mix	Ausgangskon- zentration	Volumen [µl]
H ₂ O steril			16,1
5x GoTaq® Reaktionspuffer (1,5 mM MgCl ₂ , pH 8,0)	1x	5x	5,0
dNTPs Promega	0,2 mM	10 mM	0,5
Oligonukleotid-Mix (Sigma-Proligo)	0,18 µM	15 µM	0,3
GoTaq-Polymerase (Promega)	0,0025 U/µl	5 U/µl	0,1
DNA- Matrize			3
Gesamt			25

Tab. 10: Master-Mix für Standard-PCR-Reaktion

Nachdem sämtliche Zutaten für den Master-Mix pipettiert waren, wurden sie auf dem Schüttler gut durchmischt. Je 22,0 µl des Master-Mixes wurden in 0,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert. Anschließend wurden jeweils 3 µl der durch die DNA-Isolation gewonnen Matrize dazugegeben. Im Einzelfall war es nötig, eine höhere Menge an DNA-Matrize einzusetzen, da die Proben in unterschiedlichen Konzentrationen vorlagen. In einem solchen Fall wurde dann dementsprechend weniger H₂O eingesetzt. Nachdem sie noch einmal kurz geschüttelt und abzentrifugiert worden waren, kamen die Proben in das PCR-Gerät (mit geheiztem Deckel) und das entsprechende PCR-Programm konnte gestartet werden (Tab. 11).

94°C	3 min	}35 x
94°C	1 min	
61°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
10°C	halten	

Tab. 11:
PCR-Programm

Eine PCR-Reaktion nach diesem Programm dauerte etwa 2 Stunden und 50 Minuten. Die automatische Kühlung am Ende ermöglichte auch eine PCR-Reaktion über Nacht. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurden die Proben kurz abzentrifugiert, da Kondensationstropfen am Deckel des Reaktionsgefäßes entstanden waren. Anschließend wurden die Proben im Kühlschrank bei 4°C gelagert oder eingefroren, falls eine längere Zeit bis zur Weiterbearbeitung absehbar war.

3.3 MDM2/MSPA1I - Verdau

3.3.1 Prinzip des Restriktionsverdaus PCR-amplifizierter DNA

In der Restriktionsanalyse wird amplifizierte DNA unter anderem auf Punktmutationen oder DNA-Polymorphismen untersucht. Nukleotidsequenzen innerhalb von zwei homologen Allelen, die einen Polymorphismus aufweisen, stellen Schnittstellen für Restriktionsenzyme dar. Wenn eine der Restriktionsschnittstellen polymorph ist, zeichnen sich die homologen Allele durch das Fehlen bzw. die Gegenwart einer Restriktionsstelle des verwendeten Enzyms aus. Nach Restriktionsverdau der DNA resultieren unterschiedlich lange DNA-Fragmente (Kulozik et al., 2000).

Restriktionsenzyme - auch als Restriktionsendonukleasen bezeichnet - sind enzymatische „Scheren“, mit denen doppelsträngige DNA sequenzspezifisch geschnitten werden kann. Natürlicherweise kommen diese Enzyme in Bakterien vor, wo sie als prokaryontes Abwehrsystem fremde DNA abbauen und so zum Beispiel die Effektivität eines Virus einschränken (= restringieren), mit der es ein Bakterium infizieren kann. Der Name der Restriktionsenzyme leitet sich aus dieser natürlichen Funktion ab (Kulozik et al., 2000).

Die Restriktionsenzyme sind unerlässlich zur Analyse der Chromosomenstruktur, zur Sequenzierung sehr langer DNA-Moleküle, zur Isolierung von Genen und zur Erzeugung neuer DNA-Moleküle, die dann kloniert werden können. Außerdem haben sie ein wichtiges Einsatzgebiet in der Detektion von Punktmutationen oder DNA-Polymorphismen (Stryer et al., 2003). Die herausragende Eigenschaft der Restriktionsenzyme ist die Spezifität ihrer Erkennungssequenzen von meist vier bis acht Basenpaaren Länge. Dies bedeutet, dass ein bestimmtes Restriktionsenzym die DNA immer an der gleichen, genau definierten Stelle spaltet. Zum ersten Mal wurden Restriktionsenzyme Ende der sechziger Jahre verwendet. Zur Zeit sind einige hundert gereinigte Restriktionsenzyme mit jeweils unterschiedlichen Erkennungssequenzen kommerziell erhältlich (Kulozik et al., 2000).

Die grundlegende Reaktion, die von Restriktionsenzymen katalysiert wird, ist die Hydrolyse des Phosphodiesterückgrats der DNA. Die Produkte dieser Reaktion sind DNA-Stränge mit einem freien 3'-Hydroxylgruppenende und einer 5' Phosphorylgruppe. (Stryer et al., 2003).

3.3.2 Restriktionsverdau in der MDM2-SNP309-RFLP-Analyse

Bei dem zu untersuchenden SNP309 handelt es sich um einen Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP). Durch einen solchen Polymorphismus kommt es zur Zerstörung oder Neubildung von Restriktionsstellen bzw. zur Veränderung eines Restriktionsmusters (Kulozik et al., 2000). Verschiedene Forschungsgruppen haben bereits mit diesem SNP gearbeitet und ebenfalls den Restriktionsverdau mit MspA1I angewandt (Sotamaa et al., 2005). Das Restriktionsenzym MspA1I wurde aus *Moraxella species* isoliert und in einem *E.coli*-Stamm vervielfältigend gezüchtet. Seine Erkennungssequenz ist:

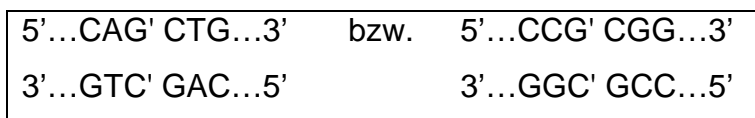


Abb. 9: Erkennungssequenz des MspA1I-Restriktionsenzym

Hier wird die zweizählige Rotationssymmetrie, eine auffällige Eigenschaft der meisten Restriktionsenzym-Schnittstellen, deutlich. Die Sequenzen sind nicht nur komplementär, sondern an ihrer Schnittstelle auch spiegelbildlich zueinander (Palindrome). Schnittstellen können einander gegenüber angeordnet oder auch versetzt sein (Stryer et al., 2003). MspA1I spaltet die beiden Stränge an gegenüberliegenden Stellen, so dass keine kurzen einzelsträngigen Enden entstehen.

Der DNA-Strang wird an der Position 309 geschnitten, falls dort der SNP309 vorliegt, also Guanin eingebaut ist. Dadurch wird das ursprünglich 157 bp große DNA-Stück in ein 106 bp großes und ein 51 bp großes Stück geteilt. Liegt dieser Polymorphismus nicht vor und an der Position 309 befindet sich die Base Thymin, hat das Enzym keinen Angriffspunkt und das DNA-Stück bleibt ungeschnitten 157 bp lang (Abb. 10).

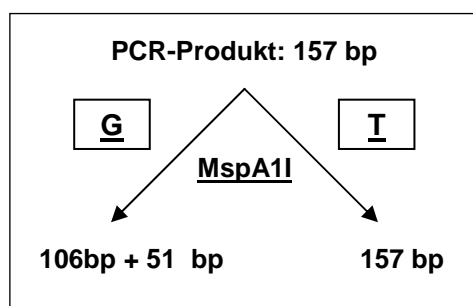


Abb. 10: Arbeitsweise des MspA1I-Restriktionsenzym (nach Sotamaa et al., 2005)

Zum Ansetzen eines Restriktionsverdau mit MspA1I wurden die Reagenzien für eine Probe, wie in Tabelle 12 gezeigt, pipettiert. Zu den 10 µl Verdauansatz wurden 20 µl des PCR-Produkts pipettiert. Nach kurzem Schütteln und Abzentrifugieren wurde der Reaktionsansatz über Nacht bei 37°C im Wärmerraum inkubiert. Anschließend folgte die Lagerung im Kühlschrank bei 4°C. Es bestand aber auch die Möglichkeit, die Proben wiederum einzufrieren.

Komponente	Endkonzentration	Ausgangskonzentration	Volumen [µl]
MspA1I (NEB Biolabs)	5 U	10 U	0,5
Puffer 4 (NEB Biolabs)	1 x	10 x	3
BSA (NEB Biolabs)	1 x	100 x	0,3
H ₂ O steril			6,2
gesamt			10

Tab. 12: Mastermix für den Verdau

3.4. Agarose-Gelelektrophorese

3.4.1 Prinzip der Gelelektrophorese

Eine Möglichkeit, DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge aufzutrennen, ist die Gelelektrophorese. Die geladenen Restriktionsfragmente beginnen nach Anlegung einer Spannung im Gel zu wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird nicht nur durch die Ladung der DNA, sondern auch durch die Größe des Fragments bestimmt; kleine Fragmente wandern schneller. In vielen Gelen ist die elektrophoretische Beweglichkeit eines DNA-Fragments bis zu einer bestimmten Grenze umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare (Stryer et al., 2003). Verschiedene Gelarten werden zu unterschiedlichen Zwecken eingesetzt. Agarose beispielsweise ist relativ weitmaschig und deshalb für Gemische aus längeren Fragmenten (bis zu 20 kb) gut geeignet.

3.4.2 Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese

In einem Erlenmeyerkolben wurden 2,5 mg Agarose mit 1xTAE auf 100 ml aufgefüllt und in der Mikrowelle bei 1000 W erhitzt, bis eine durchsichtige Lösung ohne größere Schlieren entstand. Nachdem die Lösung etwas abgekühlt war, wurde sie in die mit einem 24-zahnigen Kamm versehene und austangierte Gelform gegossen. Bis zum Aushärten des Gels (ca. 30 min) wurden die Proben vorbereitet. Jeweils 15 µl PCR-Produkt und 5 µl Stopppuffer wurden zusammenpipettiert, geschüttelt und kurz abzentrifugiert. Nun wurde das Gel aus der Gelform genommen und horizontal in die Gelkammer gelegt, welche mit 1xTAE als Laufpuffer gefüllt war. Vorsichtig wurde der Kamm herausgezogen. Jeweils 20 µl Probenlösung wurden in die entstandenen Vertiefungen pipettiert, als Längenstandard dienten 3 µl GeneRuler™100bp DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot). Die Laufzeit betrug 60 min bei 110 V. Anschließend wurden die Gele etwa 10 min lang in einer 0,04%-Ethidiumbromidlösung gefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid bindet sich in die DNA-Doppelhelix, so dass DNA in einem mit UV-Licht transilluminierten Gel sichtbar wird (Kulozik et al., 2000). Nach einem kurzen Wasserbad wurde das Gel unverzüglich auf einen UV-Leuchtschirm gelegt und mit Belichtungszeiten von 20-30 Sekunden fotografiert, wodurch die DNA in Form weißer Banden sichtbar wurde (Abb. 11).

3.4.3 Auswertung der Gelfotographien

Anhand der durch den Restriktionsverdau entstandenen Fragmente und deren Fragmentmuster auf dem Agarosegel konnte direkt auf den vorliegenden Genotyp geschlossen werden (Abb. 11). Bei Vorliegen der Base Guanin entstanden zwei Fragmente (106 bp + 51 bp), mit Thymin blieb das DNA-Fragment ungeschnitten (157 bp).

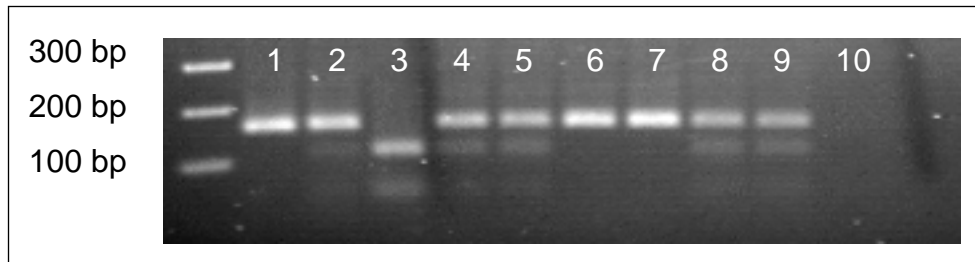


Abb. 11: Agarosegelelektrophorese zur Analyse der MDM2-SNP309. Am linken Rand des Gels ist ein Längenstandard aufgetragen, dessen Banden einen Abstand von 100 bp aufweisen. Entsprechend lassen sich die Querbanden auf den einzelnen Spuren ablesen. Die vielen hunderttausend bis einige Millionen unterschiedlichen Fragmente der verdauten DNA verschwimmen in einer homogen erscheinenden Spur.

	Probennummer	SNP309-Genotyp		Probennummer	SNP309-Genotyp
Spur 1	UROtsa	Homo T	Spur 6	19063/99 (NZK)	Homo T
Spur 2	HT29	Hetero	Spur 7	1119/94 (NZK)	Homo T
Spur 3	RT4	Homo G	Spur 8	2195/94 (NZK)	Hetero
Spur 4	2644/92 (NZK)	Hetero	Spur 9	8540/03 (NZK)	Hetero
Spur 5	3391/97 (NZK)	Hetero	Spur 10	H ₂ O	

3.5 Fragmentanalyse

3.5.1 Funktionsweise des ABI Prism® 3100 and 3100-Avant Genetic Analyzer

In der Fragmentanalyse werden die DNA-Fragmente einer Probe bezüglich ihrer unterschiedlichen Länge getrennt. Die Länge eines jeden Fragments wird untersucht und gemessen, um anschließend in Basenpaaren angegeben werden zu können. Die relative Konzentration jedes Fragments in der Probe wird geschätzt.

Gegenüber der Auftrennung der DNA-Restriktionsfragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese hat die Fragmentanalyse am ABI den Vorteil, deutlich sensitiver zu sein und klarere Ergebnisse zu liefern. Außerdem beträgt die aktive Arbeitszeit nur einen Bruchteil derjenigen, die für die Gelelektrophorese aufgebracht werden muss. Allerdings ist diese Art der Analyse auch kostenintensiver.

1. Probenvorbereitung: Fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente werden in die Vertiefungen einer Reaktionsplatte pipettiert. Der Farbstoff ermöglicht das Auffinden und die Identifikation von DNA während der Analyse. Bis zu fünf verschiedene Farben könnten für eine Probe verwendet werden.
2. Computervorbereitung: Die Position der einzelnen Proben innerhalb der Reaktionsplatte kann am Computer eingetragen werden
3. Beginn der Messung: Die Reaktionsplatte wird in den 3100-Avant Genetic Analyzer gelegt und automatisch in die richtige Position gebracht, so dass sie den Kapillaren zugänglich ist.
4. Elektrophorese: Dünne Silikat-Kapillaren und Elektroden tauchen in je eine Probe ein. Es wird eine Spannung angelegt, worauf die Elektrophorese aller Proben gleichzeitig beginnt. Die negativ geladenen DNA-Moleküle aus den Proben wandern in den mit Polymer gefüllten Kapillaren zur Anode. Hierbei bewegen sich die kürzeren Fragmente schneller als die längeren. Die Elektrophorese wird bei einer Temperatur von 60°C durchgeführt.
5. Anregung und Detektion: Am Detektionsort treten die Fragmente durch einen energetisch anregenden Laserstrahl, der den Fluoreszenzfarbstoff der Fragmente zum Leuchten bringt. Die Fluoreszenz wird von einem optischen Gerät detektiert.
6. Datensammlung: Die CCD-Kamera wandelt die Fluoreszenz-Information in elektronische Informationen um, welche dann auf den Computerarbeitsplatz transferiert werden.
7. Datenverarbeitung: Nachdem die Informationen durch die 3100-Avant Software bearbeitet worden sind, werden sie als Elektropherogramm auf dem Bildschirm dargestellt und stehen zur Auswertung bereit (Applied Biosystems, 2002).

3.5.2 Durchführung und Auswertung der Fragmentanalyse

Mit Hilfe des Kits Genescan 400HD, ABI (Applied Biosystems, Foster City, USA) wurde der Mastermix für die Fragmentanalyse am ABI pipettiert. Tabelle 13 zeigt das Schema für eine Reaktion. Die jeweils 12 µl des Mastermixes wurden in eine Vertiefung der Reaktionsplatte pipettiert und 1,5 µl verdautes PCR-Produkt hinzugefügt. Daraufhin konnte die Analyse durch den 3100-Avant Genetic Analyzer gestartet werden.

Komponenten	Volumen [µl]
HIDI	11,5
Standard (ROX)	0,5
Gesamt	12

Tab. 13: Mastermix für die Fragmentanalyse am ABI

Die Validität der Fragmentanalyse wurde durch eine Sequenzierung des betrachteten DNA-Abschnittes erfolgreich überprüft. Beide Methoden brachten übereinstimmende Ergebnisse (Abb. 12).

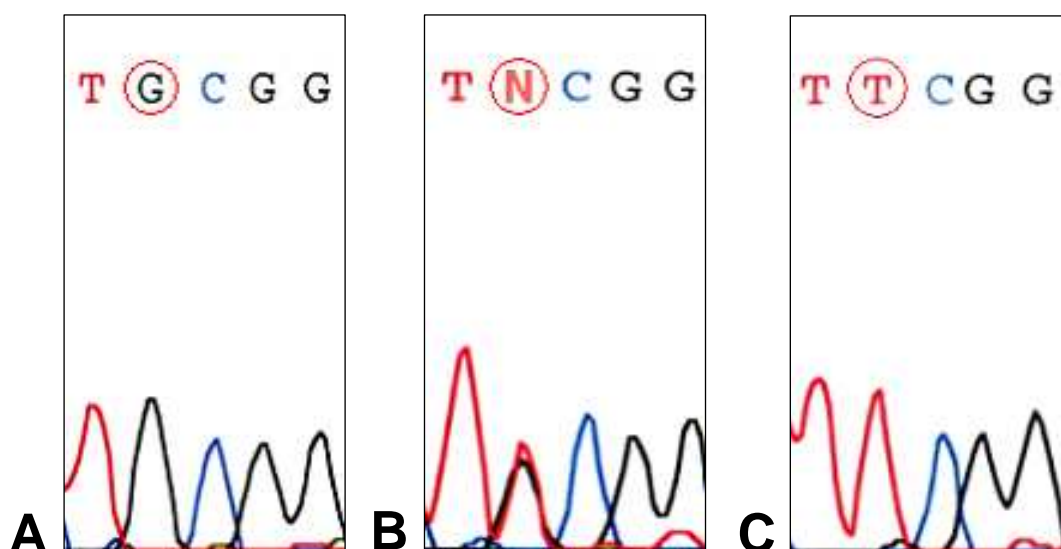


Abb. 12: DNA-Sequenzierung. Alle vier (Di-)Desoxyribonukleotide sind im Reaktionsgemisch vorhanden, jedoch mit unterschiedlichen Farbstoffen fluoreszenzmarkiert. Die Reihenfolge der Fluoreszenz in der Elektrophorese-Kapillare erlaubt die Bestimmung der DNA-Sequenz. **A** homozygot G; **B** heterozygot; **C** homozygot T

Die Analyse der Proben lief über Nacht, so dass am nächsten Morgen die Auswertung der Proben am Computer möglich war. Die Elektropherogramme wurden zunächst auf einen richtigen Diagrammbereich eingestellt. Auf der Abszisse war die Anzahl der Basenpaare aufgetragen. Da die Fragmentgröße maximal 157 bp betrug, war ein Arbeitsbereich von 200 bp günstig. Die Ordinate stellte die relativen Fluoreszenz-Farbstoff-Konzentrationen dar; hier konnte gut eine Einstellung zwischen 8.000 und 10.000 gewählt werden. An der Stelle der Fluoreszenzmaxima konnte im Elektropherogramm die Fragmentgröße auf der Abszisse abgelesen werden. Die Ausdehnung entlang der Ordinate ließ auf die eingesetzte DNA-Menge, deren Qualität und den erfolgreichen Einbau von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden schließen. Die unverbrauchten Oligonukleotide schlugen sich als Fluoreszenzgipfel bei 10 bp nieder:

In der vorangegangenen PCR wurden Oligonukleotide verwendet, von denen nur der an den 5'→3'-Strang bindende fluoreszenzmarkiert war. Das Oligonukleotid, das mit dem 3'→5'-Strang hybridisierte, hatte keine Fluoreszenzkraft. Aus diesem Grund ist von jedem DNA-Doppelstrang nur einer der beiden Tochterstränge durch die Fragmentanalyse detektierbar. Dieses geht aus der Abbildung 13 hervor.

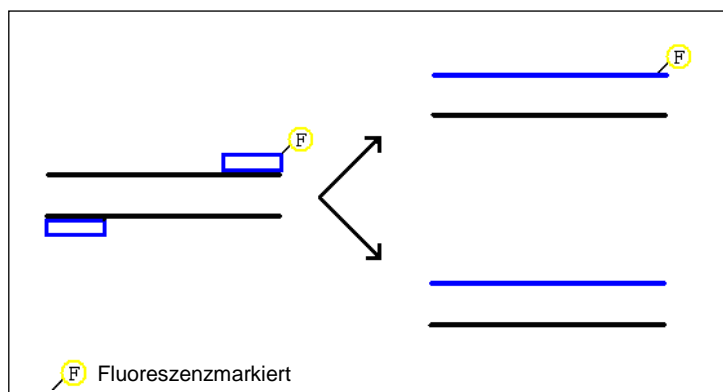
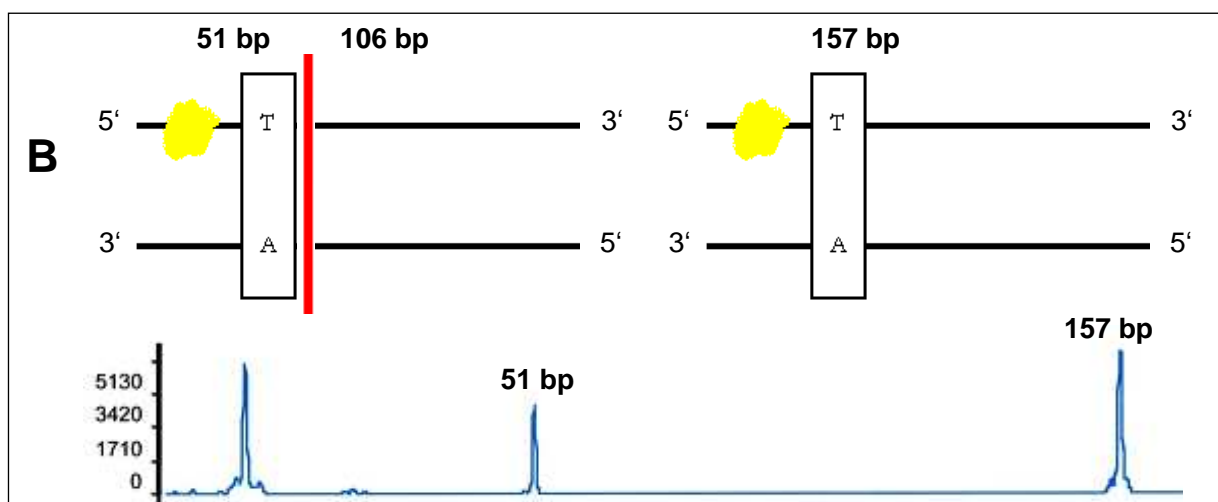
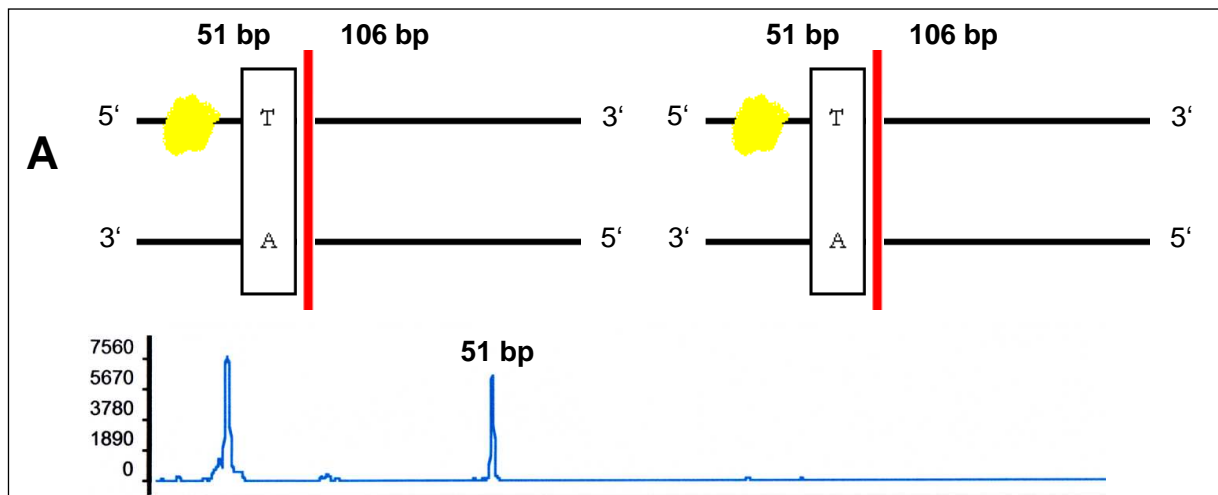


Abb. 13: Fluoreszenzmarkierung der DNA-Doppelstränge. Nur der durch den eingesetzten Primer fluoreszenzmarkierte Tochterstrang ist durch die Fragmentanalyse detektierbar.

Vier verschiedene Ergebnisse in der Auswertung waren möglich:

1. Die DNA-Probe war homozygot für G, d.h. beide homologen Chromosomen wurden vom Restriktionsenzym geschnitten und es zeigte sich ein Fluoreszenzgipfel ausschließlich bei 51 bp. Da nur das eingesetzte Oligonukleotid fluoreszenzmarkiert war und nicht das gesamte DNA-Fragment, war das 106 bp-Fragment nicht sichtbar (Abb. 14 A).

2. Die DNA-Probe war heterozygot. Ein Allel beinhaltete das T, blieb also ungeschnitten und erzeugte einen Fluoreszenzgipfel bei 157 bp, während das andere Allel ein G besaß, geschnitten worden war und ein Fluoreszenzmaximum bei 51 bp aufwies (Abb. 14 B).
3. Die DNA-Probe war homozygot für T, die DNA-Stränge blieben ungeschnitten und es zeigte sich ein Fluoreszenzgipfel bei 157 bp (Abb. 14 C).
4. Die eingesetzte DNA-Menge war nicht ausreichend, so dass die Oligonukleotide während der PCR nicht eingebaut werden konnten und sich an der Position 10 bp als Fluoreszenzgipfel zeigten. Dieser war auch in der H₂O-Negativkontrolle zu sehen.



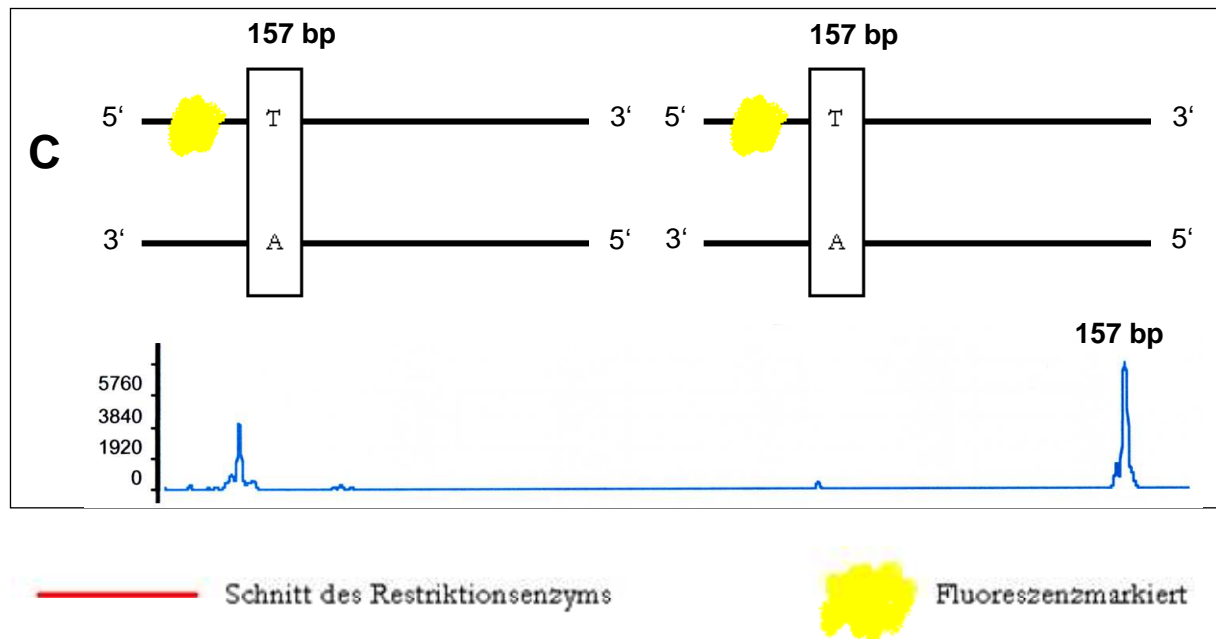


Abb. 14: Graphik zur Veranschaulichung der verschiedenen Ergebnismöglichkeiten. Nur die fluoreszenzmarkierten Fragmente werden in der Fragmentanalyse detektiert und analysiert und erzeugen einen Fluoreszenzgipfel. **A** Die DNA-Probe ist homozygot für G; **B** Die DNA-Probe ist heterozygot; **C** Die DNA-Probe ist homozygot für T.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte anhand des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson mit Hilfe von SPSS 13.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*, Version 13.0). Teilweise wurde auch der Exakte Test nach Fisher angewendet, der aber nur bei 4-Felder-Tafeln eingesetzt werden kann. Der Test nach Pearson ist nicht so robust gegenüber niedrigen Fallzahlen und nur gültig, wenn der Anteil der Zellen mit einer Häufigkeit kleiner fünf unter 20 % liegt. Das heißt, dass für bestimmte Merkmalskombinationen, die dieses Kriterium nicht erfüllen, die gegebenenfalls existierende Signifikanz des P-Wertes nicht zuverlässig ist. Im Kapitel 4 wird an betroffenen Stellen auf die Unsicherheit des Tests hingewiesen.

Die Analyse der Überlebensdaten erfolgte anhand eines Log Rank Tests (Mantel-Cox). Ergebnisse des Tests mit einem P-Wert < 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Einleitung

Von den 257 in dieser Arbeit auf ihren Genotyp untersuchten Fällen konnten 235 ausgewertet werden. 22 Gewebeproben brachten kein Ergebnis. Bei der Arbeit mit Paraffin-Geweben muss immer mit Ausfällen gerechnet werden, da die Formalinfixierung nicht nur das Gewebe durchlässig macht, sondern auch die Integrität der DNA beeinträchtigen kann. Davon kann auch die untersuchte Zielsequenz betroffen sein, die dann kein Ergebnis liefert. Außerdem ist darauf zu achten, dass ausschließlich gepuffertes Formalin zur Fixierung verwendet wird, weil das Material sonst vollständig beschädigt wird.

Ein weiterer Grund, weshalb es zu Ausfällen kommen könnte, ist eine zu geringe Menge an Ausgangsmaterial. Das ist in dieser Arbeit aber nicht der Fall, da ausschließlich das reichlich zur Verfügung stehende Normalgewebe analysiert wurde.

Anhand der sich aus den ausgewerteten Proben ergebenden MDM2-SNP309-Verteilung sowie durch den Vergleich mit einer tumorfreen Kontrollgruppe ließ sich die Aussage treffen, ob der in dieser Arbeit betrachtete Einzelnukleotid-Polymorphismus 309 (T → G) in der Promotorregion des MDM2-Gens Rückschlüsse auf ein erhöhtes Erkrankungsrisiko sowie einen früheren Erkrankungsbeginn beim NZK zulässt.

Zunächst soll ein allgemeiner Überblick über die Genotypenverteilung der erhobenen Daten gegeben werden (Tab. 14; Abb. 15).

SNP309 Genotyp	Gesamt	G/G	G/T	T/T
Häufigkeit	235	34	106	95
%	100	14,5	45,1	40,4

Tab. 14: Verteilung der Genotypen aller ausgewerteter Proben aus der Gruppe der Tumorpatienten

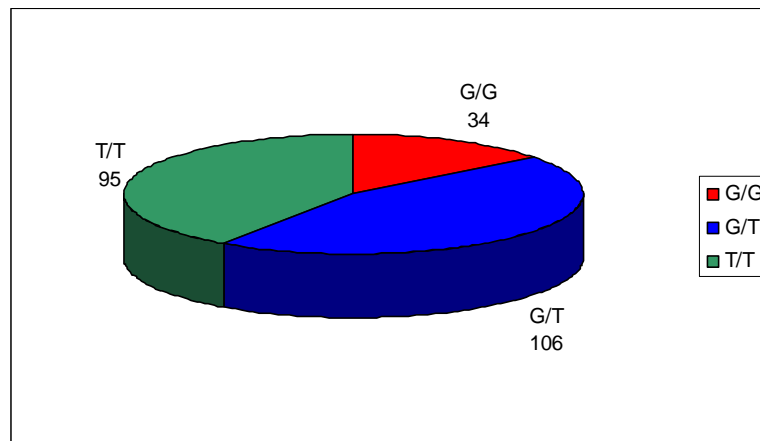


Abb. 15: Verteilung der Genotypen in der Gruppe der Tumorpatienten

Die meisten Proben (45,1 %) ließen sich dem Genotyp G/T zuordnen. Am geringsten war die Anzahl der G/G-Träger mit 34 (14,5 %); der T/T-Genotyp lag bei 40,4 % vor. Im Folgenden werden diese Ergebnisse unter verschiedenen Aspekten dargestellt.

4.2 Verteilung der SNP309-Genotypen nach histopathologischen Kriterien

Zunächst soll der Zusammenhang zwischen der Verteilung der Genotypen des SNP309 und den histopathologischen Eigenschaften der Tumoren betrachtet werden. Entsprechend der allgemeinen Verteilung der SNP309-Genotypen dieser Arbeit stellt der heterozygote Genotyp den größten Anteil dar, auf die T/T-Variante entfällt die zweithöchste Fallzahl und der untersuchte G/G-Genotyp hat die geringste Frequenz. Unter der Annahme, dass das G-Allel die Krebsanfälligkeit beim NZK beinhaltet, wurden die einzelnen histopathologischen Aspekte auch hinsichtlich ihrer Allelverteilung untersucht. Verglichen wurden Patienten, bei denen ein G-Allel vorhanden war (G/G- und G/T-Träger), mit denen, die kein G-Allel trugen, also T/T-Trägern.

Anhand der TNM-Klassifikation soll hier als erstes die Tumorausbreitung betrachtet werden, die bei 203 Fällen bestimmt werden konnte. Bei der Betrachtung der Genotypenverteilung auf die T-Stadien fiel auf, dass die heterozygote Variante (G/T) mit 90 Fällen (44,3 %) den insgesamt am häufigsten vorkommenden Genotyp darstellte. Bezogen auf die einzelnen Stadien war das Überwiegen des

heterozygoten Typs in den Stadien T1a und T2 ebenfalls deutlich, in den Stadien T3a und T3b bildete die homozygote T/T-Form mit 16 (61,5 %) bzw. 11 (55,0 %) die größte Gruppe. In allen T-Stadien war der G/G-Genotyp die am geringsten vertretene Gruppe (5,0 - 18,2 %). Allerdings ergab sich nach Auswertung der Ergebnisse kein statistisch signifikanter Unterschied ($P = 0,257$) in der Genotypenverteilung (Tab. 15; Abb. 16).

Bezüglich des G-Allel-Vorkommens zeigte sich ebenfalls keine Signifikanz ($P = 0,064$). Entsprechend der Genotypenverteilung war das G-Allel in den Stadien T1a/b und T2 deutlich häufiger vorhanden als abwesend, in den Gruppen T3a und T3b kehrte sich dieses Verhältnis aber um (Tab. 15; Abb. 16).

T-Stadium	n	SNP309 Genotyp Häufigkeit (%)			
		G-Allel vorhanden			G-Allel nicht vorhanden
		G/G	G/T	G/G + G/T	T/T
T1a	80	14 (17,5)	40 (50,0)	54 (67,5)	26 (32,5)
T1b	44	8 (18,2)	18 (40,9)	26 (59,1)	18 (40,9)
T2	33	5 (15,2)	16 (48,5)	21 (63,6)	12 (36,4)
T3a	26	2 (7,7)	8 (30,8)	10 (38,5)	16 (61,5)
T3b	20	1 (5,0)	8 (40,0)	9 (45,0)	11 (55,0)
Gesamt	203	30 (14,8)	90 (44,3)	120 (59,1)	83 (40,9)

Tab. 15: Verteilung der Genotypen und Allele auf die T-Stadien

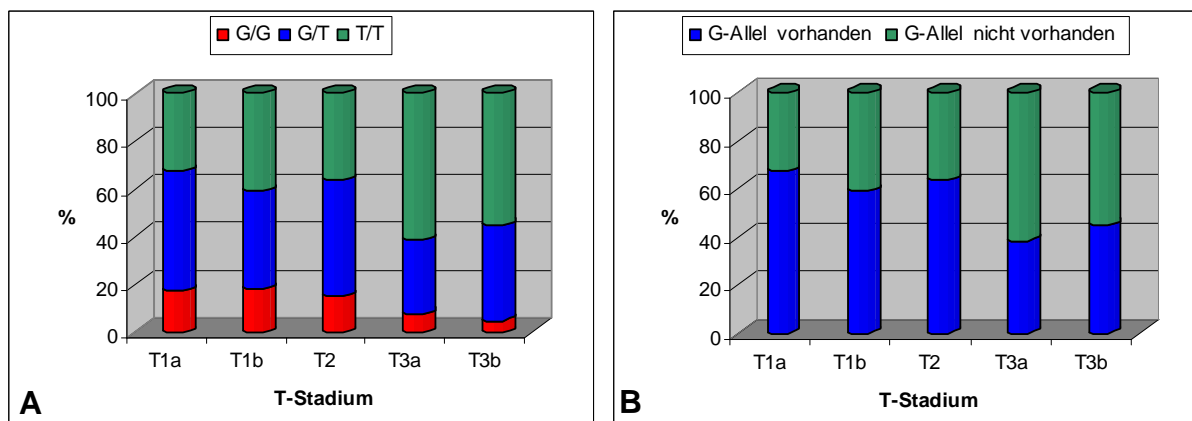


Abb. 16: Graphische Darstellung der Verteilung von (A) Genotypen und (B) Allelen auf die T-Stadien

Tabelle 16 und Abbildung 17 zeigen die Verteilung der Genotypen und Allele hinsichtlich des Lymphknotenbefalls. Es konnten 173 Fälle ausgewertet werden, bei denen ein deutlich überwiegender Teil (164 Proben (94,8 %)) keinen Lymphknotenbefall aufwies (N0).

Der errechnete Signifikanzwert bezüglich der Verteilung der Genotypen ($P = 0,033$) und der Allele ($P = 0,003$) muss vorsichtig interpretiert werden; zum einen aufgrund der geringen Fallzahlen bei N1 und N2 und zum anderen, weil der Anteil der Zellen mit einer Häufigkeit kleiner fünf bei 66,7 % lag und der Test somit als unsicher anzusehen ist.

N-Stadium	n	SNP309 Genotyp Häufigkeit (%)			
		G-Allel vorhanden			G-Allel nicht vorhanden
		G/G	G/T	G/G + G/T	T/T
N0	164	26 (15,9)	77 (47,0)	103 (62,8)	61 (37,2)
N1	1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)
N2	8	0 (0,0)	1 (12,5)	1 (12,5)	7 (87,5)
Gesamt	173	26 (15,0)	78 (45,1)	104 (60,1)	69 (39,9)

Tab. 16: Verteilung der Genotypen und Allele auf die N-Stadien

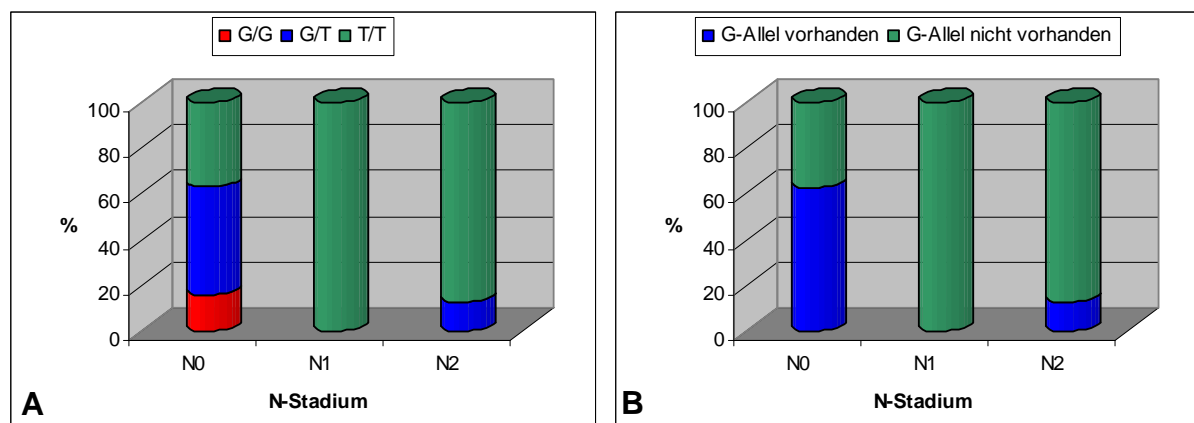


Abb. 17: Graphische Darstellung der Verteilung von (A) Genotypen und (B) Allelen auf die N-Stadien

Bei der Betrachtung der 161 nach ihrem Metastasierungsstadium auswertbaren Fälle zeigte sich, dass Patienten, die einen Tumor im M1-Stadium hatten, vorwiegend den

Genotyp T/T besaßen und damit einen höheren Anteil an homozygoten T-Trägern aufwiesen (55,6 %) als die M0-Proben (40,1 %). Im M0-Stadium war der G/T-Genotyp am häufigsten vertreten. Sowohl bei Patienten mit zum Diagnosezeitpunkt metastasiertem als auch mit lokal begrenztem Tumor war die G/G-Variante die am geringsten vertretene (Tab. 17; Abb. 18). Diese Unterschiede waren statistisch aber nicht signifikant ($P = 0,724$). Auch der Vergleich bezüglich des Allelvorkommens zeigte keine Signifikanz ($P = 0,489$). Da der Anteil der Zellen mit einer Häufigkeit kleiner fünf bei 50 % für die Genotypen bzw. bei 25 % für die Allele lag, ist dieser Test als unsicher anzusehen.

M-Stadium	n	SNP309 Genotyp Häufigkeit (%)			
		G-Allel vorhanden			G-Allel nicht vorhanden
		G/G	G/T	G/G + G/T	T/T
M0	152	20 (13,2)	71 (46,7)	91 (59,9)	61 (40,1)
M1	9	1 (11,1)	3 (33,3)	4 (44,4)	5 (55,6)
Gesamt	161	21 (13,0)	74 (46,0)	95 (59,0)	66 (41,0)

Tab. 17: Verteilung der Genotypen und Allele auf die M-Stadien

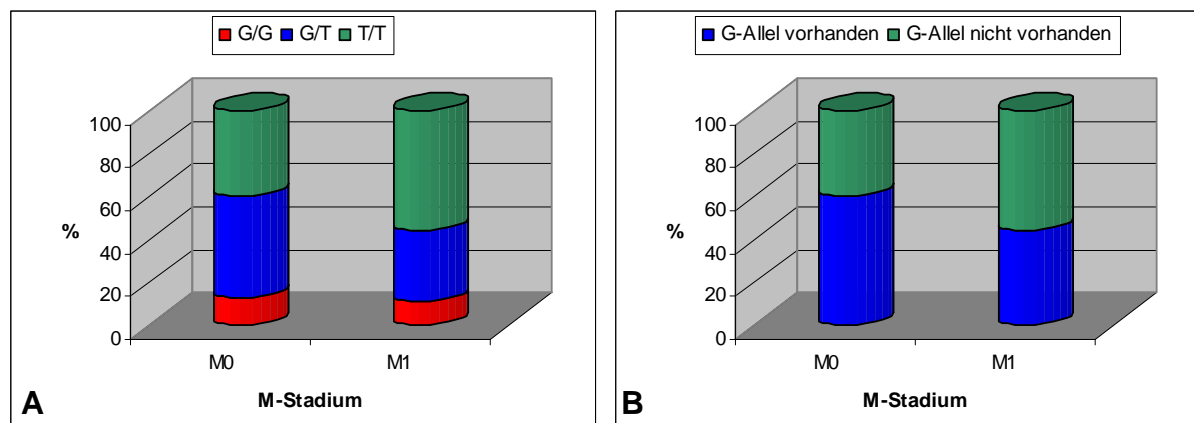


Abb. 18: Graphische Darstellung der Verteilung von (A) Genotypen und (B) Allelen auf die M-Stadien

Das Tumorstadium nach UICC-Kriterien ließ sich anhand von 159 auswertbaren Fällen betrachten. 60,4 % des Materials entfielen auf das Tumorstadium 1. Es zeigte sich, dass bei Patienten mit den prognostisch günstigeren Tumorstadien 1 und 2 der

G/T-Genotyp überwog, während in den Stadien 3 und 4 mehr Fälle mit dem Genotyp T/T zu finden waren (Tab. 18; Abb. 19). Dennoch waren auch hier die beobachteten Unterschiede nicht signifikant ($P = 0,213$).

Ebenso verhielt es sich mit der Verteilung des G-Allels auf die Tumorstadien (Tab. 18; Abb. 19). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Tumorstadien war nicht festzustellen ($P = 0,057$).

Tumor- stadium	n	SNP309 Genotyp Häufigkeit (%)			
		G-Allel vorhanden			G-Allel nicht vorhanden
		G/G	G/T	G/G + G/T	T/T
Stadium 1	96	15 (15,6)	48 (50,0)	63 (65,6)	33 (34,4)
Stadium 2	17	3 (17,6)	8 (47,1)	11 (64,7)	6 (35,3)
Stadium 3	31	2 (6,5)	13 (41,9)	15 (48,4)	16 (51,6)
Stadium 4	15	1 (6,7)	4 (26,7)	5 (33,3)	10 (66,7)
Gesamt	159	21 (13,2)	73 (45,9)	94 (59,1)	65 (40,9)

Tab. 18: Verteilung der Genotypen und Allele auf die Tumorstadien

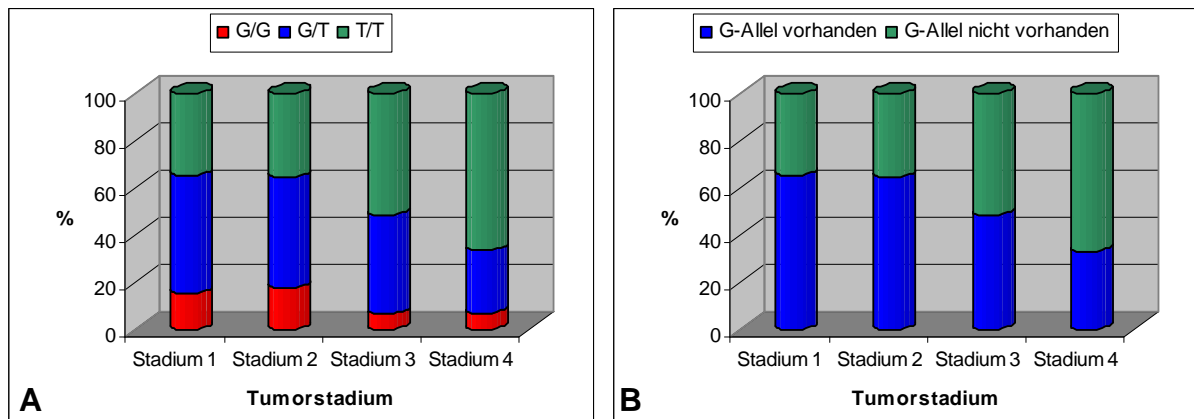


Abb. 19: Graphische Darstellung der Verteilung von (A) Genotypen und (B) Allelen auf die Tumorstadien

Zur abschließenden histopathologischen Beurteilung gehört auch der Differenzierungsgrad der untersuchten Tumoren. Es konnten 205 Fälle bezüglich ihres Differenzierungsgrades ausgewertet werden. Dabei zeigte sich bei Patienten mit niedrigeren G-Stadien eine Häufung des G/T-Genotyps, während im G3-Stadium

die T/T-Form überwog. Aufgrund der geringen Anzahl der Fälle im G4-Stadium konnte hier keine Aussage getroffen werden. Während sich die Differenzierungsstadien hinsichtlich der Genotypen nicht signifikant unterschieden ($P = 0,166$), konnte für die Allelverteilung ein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden ($P = 0,02$). Diese Signifikanz ist allerdings als unsicher anzusehen, da Zellen mit einer Häufigkeit kleiner fünf in über 20 % vorlagen und die Fallzahl für G4 mit einem Fall zu gering war (Tab. 19; Abb. 20).

Differenzierungsgrad	n	SNP309 Genotyp Häufigkeit (%)			
		G-Allel vorhanden			G-Allel nicht vorhanden
		G/G	G/T	G/G + G/T	T/T
G1	51	9 (17,6)	26 (51,0)	35 (68,6)	16 (31,4)
G2	126	20 (15,9)	56 (44,4)	76 (60,3)	50 (39,7)
G3	27	2 (7,4)	8 (29,6)	10 (37,0)	17 (63,0)
G4	1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)
Gesamt	205	31 (15,1)	90 (43,9)	121 (59,0)	84 (41,0)

Tab. 19: Verteilung der Genotypen und Allele auf die Differenzierungsgrade

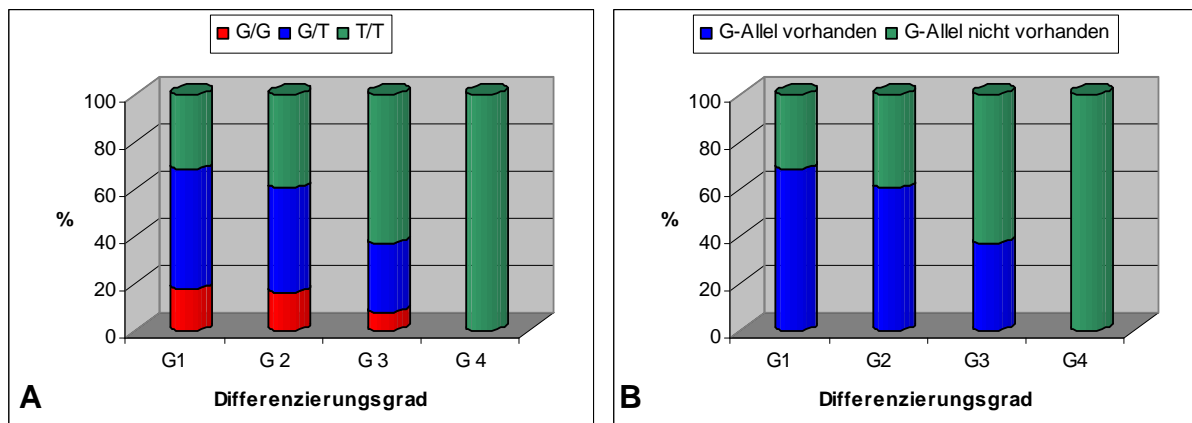


Abb. 20: Graphische Darstellung der Verteilung von **(A)** Genotypen und **(B)** Allelen hinsichtlich der Differenzierungsgrade

Hinsichtlich der histopathologischen Kriterien ergab sowohl die Betrachtung der UICC-Stadien als auch die differenzierte Untersuchung der TNM-Klassifikation und des Differenzierungsgrads keine Korrelation mit den Ausprägungen des MDM2-SNP309.

4.3 Verteilung der SNP309-Genotypen auf die Subtypen

Die von den Patienten entwickelten Nierentumoren verteilten sich wie folgt auf die verschiedenen histologischen Subtypen (Tab. 20):

Histologische Subtypen	Anzahl (n = 235)	%
Hellzellig	99	42,1
Papillär	30	12,8
Chromophob	86	36,6
Onkozytom	4	1,7
Spindelzellig	2	0,9
Undifferenziert	4	1,7
Sammelrohrkarzinom	1	0,4
Hellzellig mit papillärem Anteil	3	01,3
Unklarer Subtyp	6	12,5

Tab. 20: Verteilung der Proben auf die histologischen Nierenzellkarzinomsubtypen

215 Fälle entfielen auf die drei am häufigsten vorkommenden malignen Tumoren: 99 hellzellige (CC), 30 papilläre (PAP) und 86 chromophobe (CP) Nierenzellkarzinome. Zwischen diesen drei Gruppen konnte weder bezüglich ihrer SNP309-Genotypenverteilung ($P = 0,699$) noch hinsichtlich der Allelverteilung ($P = 0,132$) ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Tab. 21; Abb. 21).

Subtypen	n	SNP309 Genotyp Häufigkeit (%)			
		G-Allel vorhanden			G-Allel nicht vorhanden
		G/G	G/T	G/G + G/T	T/T
CC	99	18 (18,2)	44 (44,4)	62 (62,6)	37 (37,4)
PAP	30	3 (10,0)	12 (40,0)	15 (50,0)	15 (50,0)
CP	86	12 (14,0)	39 (45,3)	51 (59,3)	35 (40,7)
Gesamt	215	33 (15,3)	95 (44,2)	128 (59,5)	87 (40,5)

Tab. 21: Verteilung der Genotypen und Allele auf die drei häufigsten malignen NZK-Subtypen (CC: hellzellig, PAP: papillär, CP: chromophob)

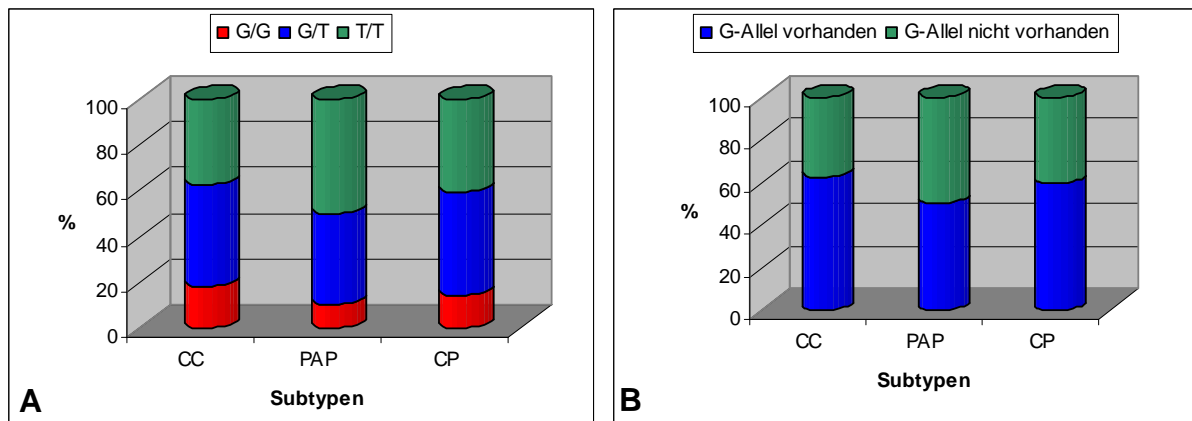


Abb. 21: Graphische Darstellung der Verteilung von (A) Genotypen und (B) Allelen auf die NZK-Subtypen (CC: hellzellig, PAP: papillär, CP: chromophob)

Die Ausprägung des Polymorphismus und die entwickelten histologischen NZK-Subtypen korrelieren nicht miteinander. Es liegt also kein Zusammenhang zwischen dem Genotyp bzw. dem Allelvorkommen und der Prädisposition für einen bestimmten Subtyp des Nierenzellkarzinoms vor.

4.4 Einfluss der SNP309-Genotypen auf das Überleben

Von den insgesamt 235 auswertbaren Fällen wurden 118 der Patientenschicksale nachverfolgt bzw. deren niedergelassener Arzt kontaktiert. Auf diese Weise war es möglich, das Überleben der Patienten mit Nierenzellkarzinom im Zustand nach Nephrektomie zu dokumentieren. Die Anzahl der Fälle, bei denen keine

Verlaufsdaten vorliegen (*losses to follow up*) beläuft sich auf 117. Die 118 Patienten mit Verlaufskontrolle verteilten sich wie folgt auf die SNP309 Genotypen (Tab. 22):

SNP309 Genotyp	G/G	G/T	T/T
Häufigkeit (%)	19 (16,1)	50 (42,4)	49 (41,5)

Tab. 22: Genotypenverteilung der an der Verlaufskontrolle beteiligten Patienten

In der Kaplan-Meier-Analyse wird ein Todesfall als Ereignis bezeichnet. In der Gruppe der G/G-Genotypträger kam es im Laufe des Beobachtungszeitraumes zu 3 Ereignissen, bei den G/T-Trägern sind 4 Ereignisse bekannt und 5 Todesfälle sind in der Gruppe der T/T-Träger aufgetreten. 106 der 118 Patienten lebten zum Erhebungszeitpunkt der Daten bzw. zur Zeit der letzten wahrgenommenen Nachsorge noch. Es besteht aber keine Kenntnis über den Zeitraum danach („zensiert“). Die längste Beobachtungszeit lag bei 142 Monaten. Im Durchschnitt entspricht das einem Mittelwert von 90,7 Monaten in der G/G-Gruppe, 127,2 Monaten in der G/T-Gruppe und 125,6 Monaten bei den T/T-Trägern.

Die Abbildung 22 zeigt eine graphische Darstellung der Überlebensfunktion. Zum Zeitpunkt Null liegt die Zahl der Überlebenden bei 100 %. Jedes Ereignis bildet sich durch einen stufenhaften Abfall der Überlebenskurve ab. Die nicht mehr nachverfolgbaren Fälle werden durch einen senkrechten kleinen Strich in der Kurve dargestellt und als „zensiert“ angegeben. Es zeigte sich, dass nach knapp 90 Monaten noch über 85,8 % der Patienten mit dem Genotyp G/T und 87,1 % mit dem Genotyp T/T lebten, während in der Gruppe der G/G-Träger nur noch 59,3 % am Leben waren. Anhand des mit dem Log-Rank-Test ermittelten P-Wertes ($P = 0,616$) ließ sich allerdings zwischen den verschiedenen Genotypen kein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf das Überleben feststellen. Auch nach Betrachtung der Allelverteilung (hier nicht dargestellt) zeigte sich keine Signifikanz ($P = 0,980$).

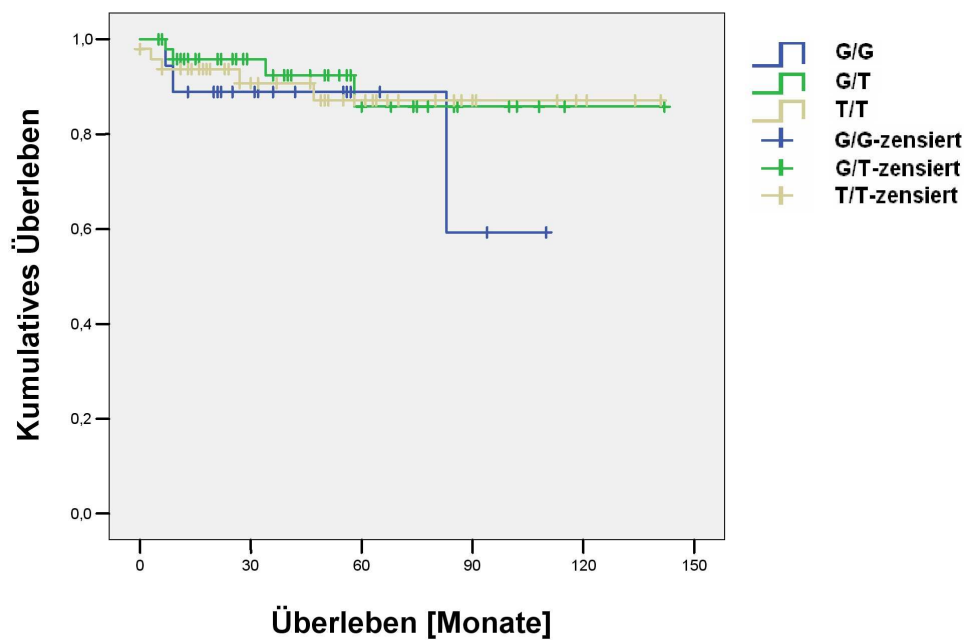


Abb. 22: Kumulatives Überleben (Ordinate) der verschiedenen MDM2-SNP309-Genotypträger bezogen auf die Überlebensmonate (Abszisse)

Der untersuchte Polymorphismus hat keinen Einfluss auf das Überleben der NZK-Patienten.

4.5 Verteilung der SNP309-Genotypen auf die Geschlechter

Männer und Frauen sind laut WHO im Verhältnis (M:F) 1,8:1 bis 3,8:1 vom Nierenzellkarzinom betroffen (Eble et al., 2004). In dieser Arbeit konnte der Genotyp von 210 Patienten mit bekanntem Geschlecht ermittelt werden. Davon waren 123 Männer und 87 Frauen, ein Verhältnis von 1,4:1. Die Verteilung der Genotypen lag bei den Männern zugunsten der homozygoten T/T-Variante, bei den Frauen war der Anteil des heterozygoten Typs am größten. Das Vorkommen des G-Allels war bei den Frauen (62,1 %) häufiger als bei den Männern (55,3 %). Tabelle 23 und Abbildung 23 zeigen die Verteilung. Sowohl die Beobachtungen in der MDM2-Genotypenverteilung ($P = 0,55$) als auch die der Allelverteilung auf Männer und Frauen ($P = 0,394$) waren statistisch nicht signifikant.

Geschlecht	n	SNP309 Genotyp Häufigkeit (%)			
		G-Allel vorhanden			G-Allel nicht vorhanden
		G/G	G/T	G/G + G/T	T/T
Männlich	123	19 (15,5)	49 (39,8)	68 (55,3)	55 (44,7)
Weiblich	87	13 (15,0)	41 (47,1)	54 (62,1)	33 (37,9)
Gesamt	210	32 (15,2)	90 (42,9)	122 (58,1)	88 (41,9)

Tab. 23: Verteilung der Genotypen und Allele auf die Geschlechter

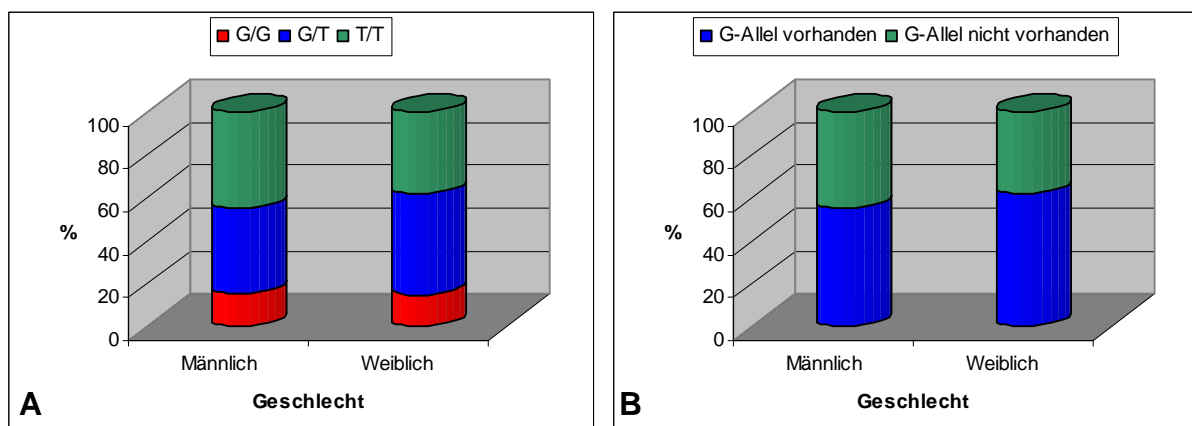


Abb. 23: Graphische Darstellung der Verteilung von (A) Genotypen und (B) Allelen auf die Geschlechter

Die Genotypen- und Allelverteilung des SNP309 korreliert beim Nierenzellkarzinom nicht mit dem Geschlecht. Somit kann kein Zusammenhang zwischen der SNP309-Ausprägung und einer erhöhten Anfälligkeit eines bestimmten Geschlechts für das Nierenzellkarzinom hergestellt werden.

4.6 Verteilung der SNP309-Genotypen auf verschiedene Altersgruppen

Die in dieser Arbeit bezüglich des Patientenalters ausgewerteten 217 Proben wurden wie in Tabelle 24 gezeigt in drei Altersgruppen eingeteilt. 63 der untersuchten Patienten waren unter 45 Jahren, 54 Patienten befanden sich zwischen ihrem 45. und 75. Lebensjahr und 100 Personen und damit der weitaus größte Teil waren

mindestens 75 Jahre alt (Abb. 24). Dabei lagen Mittelwert (62,8) und auch Median (67,0) in der Gruppe der zwischen 45- und 74-Jährigen.

Alter [Jahren]	Anzahl (n = 217)	%
< 45	63	29,0
45-74	54	24,9
≥ 75	100	46,1

Tab. 24: Altersverteilung der Proben

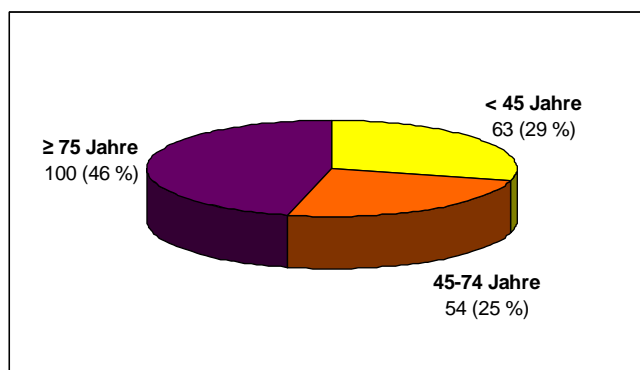


Abb. 24: Graphische Darstellung der Altersverteilung

Bei anderen sporadisch auftretenden Tumoren ist bekannt, dass der hier untersuchte Polymorphismus im MDM2-Gen einen Einfluss auf den Erkrankungsbeginn hat (Menin et al., 2006). Tabelle 25 zeigt die Ergebnisse der Genotypenverteilung beim sporadischen Nierenzellkarzinom in den verschiedenen Altersgruppen.

Alter [Jahre]	n	SNP309 Genotyp Häufigkeit (%)			
		G-Allel vorhanden			G-Allel nicht vorhanden
		G/G	G/T	G/G + G/T	T/T
< 45	63	12 (19,0)	28 (44,5)	40 (63,5)	23 (36,5)
45-74	54	10 (18,5)	22 (40,8)	32 (59,3)	22 (40,7)
≥ 75	100	12 (12,0)	44 (44,0)	56 (56,0)	44 (44,0)
Gesamt	217	34 (15,7)	94 (43,3)	128 (59,0)	89 (41,0)

Tab. 25: Verteilung der Genotypen und Allele auf die verschiedenen Altersgruppen

Bei der Betrachtung der Ergebnisse fiel auf, dass der Genotyp G/G in allen Gruppen der am seltensten vorkommende Genotyp war, während G/T und T/T dominierten. Auffällig war es auch, dass der Anteil der G/G-Träger in der Gruppe ≥ 75 Jahren deutlich geringer war als in den anderen Gruppen. Der Unterschied beträgt etwa 1/3. Das ließ den Verdacht aufkommen, dass G/G mit einem früheren Erkranken in

Verbindung stehen könnte, was sich aber statistisch nicht erhärtete ($P = 0,697$). Auch die Allelverteilung zeigte keinen signifikanten Unterschied ($P = 0,641$). Abbildung 25 stellt die Ergebnisse noch einmal graphisch dar.

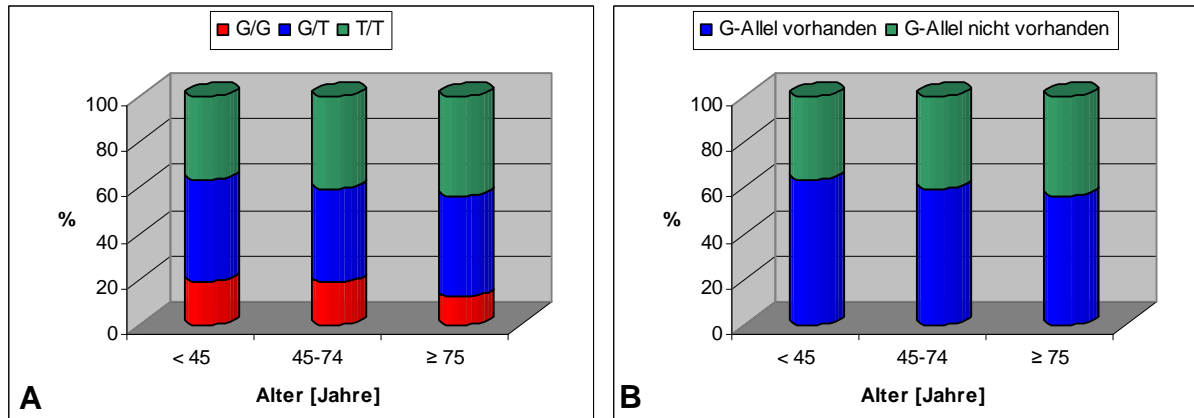


Abb. 25: Graphische Darstellung der Verteilung von (A) Genotypen und (B) Allelen auf die Geschlechter

Das statistisch nicht signifikante Ergebnis zeigte sich eindeutiger, wenn man das Alter bei Diagnosestellung gegen die Inzidenz auftrug und dabei die einzelnen Genotypen betrachtete (Abb. 26). Alle drei Kurven wiesen eine ähnliche Steigung und einen vergleichbaren Verlauf auf. Nur zwischen dem etwa 43. und 74. Lebensjahr lag der G/G-Genotyp in der Inzidenz leicht vor den beiden anderen Genotypen.

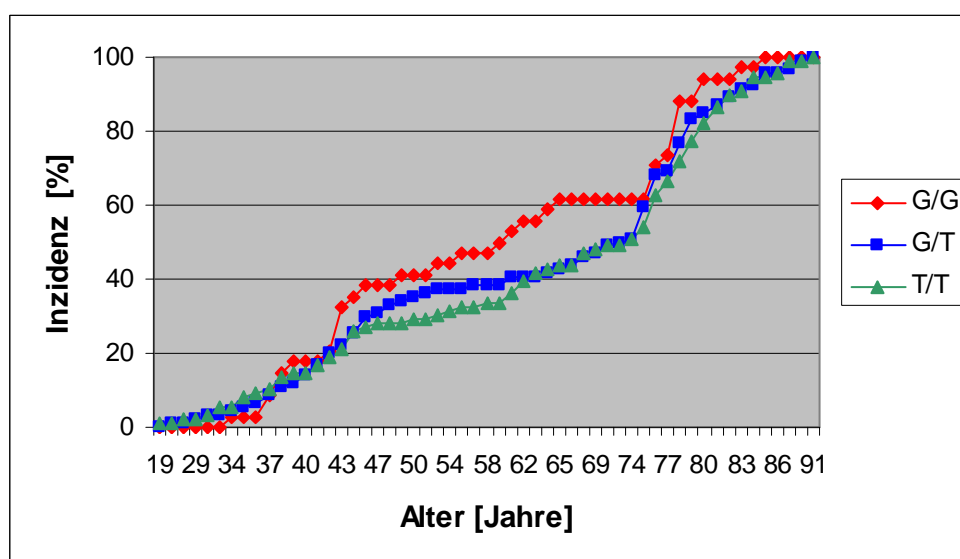


Abb. 26: Alter bei Diagnosestellung aufgetragen gegen die Inzidenz des Nierenzellkarzinoms bezüglich der drei verschiedenen Genotypen

Abschließend wurden noch einmal alle drei Altersgruppen nach Geschlechtern getrennt auf ihre Verteilung der Genotypen untersucht (Tab. 26 - Tab. 28). Es ließ sich feststellen, dass in allen Altersgruppen die Häufigkeit der Genotypen bei den Frauen dem Muster $G/T > T/T > G/G$ folgte, während die Männer eine Verteilung von $T/T > G/T > G/G$ aufwiesen. Eine Signifikanz in der Verteilung zeigte sich aber nicht (P (Tab. 26) = 0,586; P (Tab. 27) = 0,532; P (Tab. 28) = 0,813).

Geschlecht	n	SNP309 Genotyp Häufigkeit (%)		
		G/G	G/T	T/T
Männlich	45	10 (22,2)	17 (37,8)	18 (40,0)
Weiblich	15	2 (13,3)	8 (53,3)	5 (33,3)
Gesamt	60	12 (20,0)	25 (41,7)	23 (38,3)

Tab. 26: Verteilung der Genotypen auf die Geschlechter bei unter 45-Jährigen

Geschlecht	n	SNP309 Genotyp Häufigkeit (%)		
		G/G	G/T	T/T
männlich	32	4 (12,5)	13 (40,6)	15 (46,9)
weiblich	18	4 (22,2)	8 (44,4)	6 (33,3)
Gesamt	50	8 (16,0)	21 (42,0)	21 (42,0)

Tab. 27: Verteilung der Genotypen auf die Geschlechter bei 45- bis 74-Jährigen

Geschlecht	n	SNP309 Genotyp Häufigkeit (%)		
		G/G	G/T	T/T
männlich	46	5 (10,9)	19 (41,3)	22 (47,8)
weiblich	54	7 (13,0)	25 (46,3)	22 (40,7)
Gesamt	100	12 (12,0)	44 (44,0)	44 (44,0)

Tab. 28: Verteilung der Genotypen auf die Geschlechter bei über 75-Jährigen

Es besteht kein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen des G/G-Genotyps im SNP309 und einem früheren Auftreten des Nierenzellkarzinoms. Auch bei der geschlechtergetrennten Betrachtung konnte keine Verbindung zwischen den Genotypen und den verschiedenen Altersgruppen gezeigt werden.

4.7 Vergleich mit der Kontrollgruppe

Der Genotypenvergleich der Tumorpatienten mit der tumorfreien Kontrollgruppe beantwortet die grundlegende Frage dieser Arbeit: Führt das Vorliegen eines G/G- oder G/T-Genotyps an Position 309 der Promotorregion des MDM2-Gens zu einer erhöhten Inzidenz des Nierenzellkarzinoms?

Die Genotypenverteilung der Träger eines malignen NZK konnte anhand von 228 Personen bestimmt werden. Die Zahl der benignen Tumoren (n = 4) war zu klein, um aussagekräftig zu sein. In der Kontrollgruppe war es möglich, die Genotypen von 111 tumorfreien Personen zu ermitteln. Das Verteilungsmuster zeigen Tabelle 29 und Abbildung 27.

	n	SNP309 Genotyp Häufigkeit (%)			
		G-Allel vorhanden			G-Allel nicht vorhanden
		G/G	G/T	G/G + G/T	T/T
Maligner Tumor	228	33 (14,4)	100 (43,9)	133 (58,3)	95 (41,7)
Tumorfreie Kontrollgruppe	111	17 (15,3)	59 (53,2)	76 (68,5)	35 (31,5)

Tab. 29: Vergleich der Genotypen und Allele von Tumorpatienten mit denen der tumorfreien Kontrollgruppe

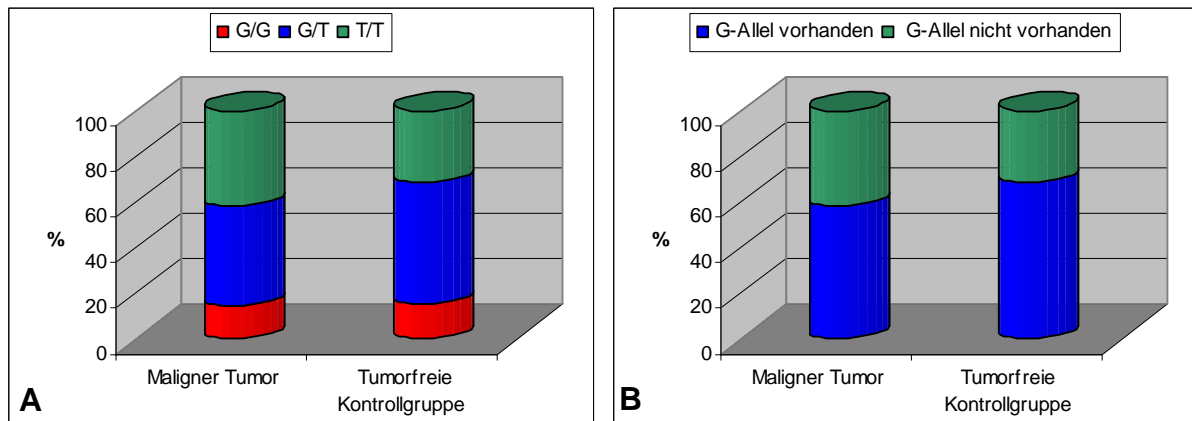


Abb. 27: Graphische Darstellung der Verteilung von **(A)** Genotypen und **(B)** Allelen im Vergleich zwischen Tumorerkrankten und tumorfreier Kontrollgruppe

Es zeigte sich, dass die prozentualen Anteile der G/G- bzw. G/T-Träger in der Gruppe der Tumorerkrankten geringer waren als die in der Kontrollgruppe. So wiesen lediglich 14,5 % des Patientenkollektivs den Genotyp G/G auf, 43,9 % entfielen auf die G/T Gruppe. In der tumorfreien Kontrollgruppe dagegen lagen die Zahlen bei 15,3 % bzw. 53,2 %. Auch das Vorkommen des G-Allels war in der tumorfreien Gruppe um 10 Prozentpunkte höher.

Entsprechend ergab auch der exakte Test nach Pearson weder hinsichtlich der Genotypen ($P = 0,199$) noch hinsichtlich der Allelverteilung ($P = 0,053$) einen statistisch signifikanten Unterschied zugunsten der Tumorerkrankten.

Aus der Abbildung 28 geht hervor, dass sich die Zusammensetzung der Kontrollgruppe dieser Arbeit in die Tendenz der Genotypenverteilung anderer vorwiegend europäischer Kollektive einreicht.

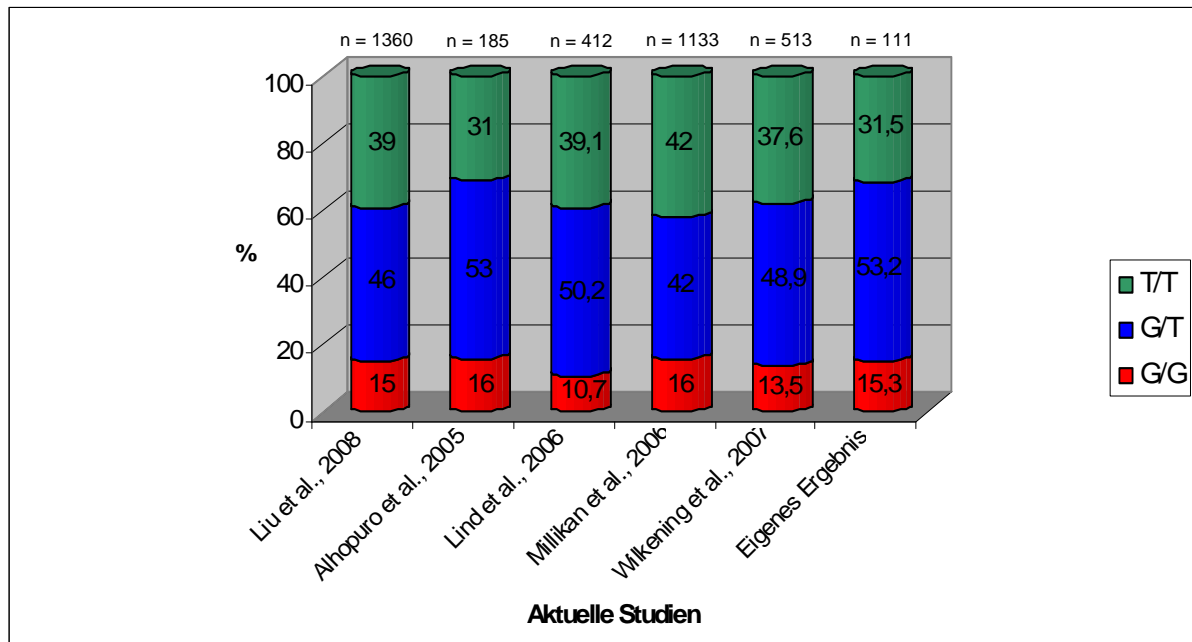


Abb. 28: Vergleich der Genotypenverteilung mit den Kontrollgruppen anderer vorwiegend europäischer Studien

Im Vergleich konnte kein Unterschied bezüglich der Verteilung der Genotypen und Allele zwischen der Kontrollgruppe und dem betrachteten Patientenkollektiv festgestellt werden.

4.8 Fazit

Anhand der im Ergebnisteil dieser Arbeit zusammengetragenen Daten lässt sich folgende Aussage treffen. Das Vorkommen des G-Allels an Position 309 der Promotorregion des MDM2-Gens korreliert weder mit einer vermehrten noch mit einer früher auftretenden Tumorerkrankung der Niere bei Europäern.

Weiterhin konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden bezüglich:

- der verschiedenen NZK-Subtypen
- der Tumorstadien
- des Differenzierungsgrads
- des Geschlechts
- des Alters
- des Überlebens

Aufgrund dieser Ergebnisse war kein Zusammenhang zwischen einem bestimmten Genotyp und einem erhöhten Erkrankungsrisiko für NZK, einem besonders niedrigen Erkrankungsalter, dem Tumorstadium bei Diagnose, dem Geschlecht und dem Überleben bei europäischen NZK-Patienten in diesem Kollektiv nachzuweisen.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Ergebnisse und ihre Einordnung in die aktuelle Literatur

Der Einzelnukleotid-Polymorphismus SNP309 im Promotor des MDM2-Gens ist ein Austausch der Base Thymin (T) durch Guanin (G). Durch das Vorliegen des G-Allels kommt es zur gesteigerten Expression von MDM2; die Folge ist eine abgeschwächte Effektivität des p53-Signalwegs mit eventuell nachfolgender Tumorentstehung (Bond et al., 2005). Für das Bronchialkarzinom wurde eine Prädisposition durch das G-Allel gefunden (Lind et al., 2006).

Diese Arbeit ist zu dem Ergebnis gekommen, dass der SNP309 das Erkrankungsrisiko für Nierenzellkarzinome nicht beeinflusst. Außerdem konnte keine Verbindung zu einem früheren Erkrankungsalter hergestellt werden. Weiterhin bestand keine Korrelation zwischen dem SNP309 und Geschlecht, Überleben, Subtypenverteilung oder Histopathologie.

Diese Ergebnisse stehen in Widerspruch zu den kürzlich von Hirata et al. (2007) publizierten Daten. Hirata et al. (2007) untersuchten als erste die Rolle des auch hier betrachteten MDM2-Polymorphismus beim NZK und kamen zu dem Ergebnis, dass eine signifikante Verbindung zwischen dem SNP309 und dem Risiko an Nierenzellkarzinom zu erkranken besteht. Außerdem wurde gezeigt, dass Patienten mit dem G/G-Genotyp eine schlechtere Prognose aufwiesen als T/T-Patienten.

Tabelle 30 zeigt die Verteilung der Genotypen dieser Arbeit im Vergleich mit der von Hirata et al. (2007). Die heterozygote G/T-Variante stellte mit fast gleichem Prozentsatz den Hauptanteil in beiden Fällen dar. Der G/G-Genotyp lag bei Hirata et al. (2007) etwa doppelt so häufig vor wie in dieser Arbeit.

Literatur	n	G/G	G/T	T/T
Hirata et al. (2007)	200	31,0 %	44,6 %	24,5 %
Eigenes Ergebnis	235	14,7 %	44,4 %	40,9 %

Tab. 30: Vergleich der Verteilung der Genotypen beim NZK (n = Anzahl der Fälle)

Entsprechend haben Hirata et al. (2007) ein im Vergleich zur Kontrollgruppe vermehrtes Vorkommen des G/G-Genotyps im MDM2-Gen von Nierentumoren gefunden. Sie leiteten daraus ab, dass der SNP309 mit einem erhöhten Risiko für das Nierenzellkarzinom assoziiert ist. In der vorliegenden Arbeit dagegen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und dem betrachteten Patientenkollektiv festgestellt werden. Die prozentualen Anteile der G/G- und G/T-Träger in der Gruppe der Tumorerkrankten waren geringer als die in der Kontrollgruppe. Somit besteht kein erhöhtes Risiko für eine NZK-Erkrankung bei Europäern mit dem G/G-Genotyp.

Bond et al. (2004) zeigten, dass der SNP309 im MDM2-Gen mit dem Diagnosealter bei Tumorerkrankungen in Verbindung steht. Sie fanden ein früheres Erkrankungsalter bei G/G-Trägern und konstatierten, dass das Vorliegen dieses Genotyps ein beschleunigtes Tumorstadium sowohl in hereditären als auch in sporadischen Tumoren bedingt.

Zustimmung erhielt dieses Ergebnis von Bougeard et al. (2006) und Ruijs et al. (2007). Sie untersuchten Patienten mit Li-Fraumeni-Syndrom (LFS). Dem Li-Fraumeni-Syndrom liegt eine Keimbahnmutation des p53 zugrunde. Es stellt eine strenge genetische Disposition für Karzinome dar. Die beiden Forschergruppen konnten einen SNP309-abhängigen Altersunterschied bestätigen; allerdings bezog sich dieser ausschließlich auf das Vorkommen der einzelnen Allele G und T. Bei Betrachtung der drei Genotypen (G/G, G/T, T/T) konnten sie keine Differenz beobachten. Weitere Studien an Nicht-LFS-Patienten bekräftigten einen früheren Beginn der Tumorgenese bei Vorliegen des G-Allels (Hong et al., 2005; Swinney et al., 2005; Alazzouzi et al., 2007).

Hirata et al. (2007) untersuchten als erste den Zusammenhang zwischen SNP309 und NZK. Auch sie konnten keinen Unterschied zwischen den drei Genotypen (G/G, G/T, T/T) bezüglich des Alters bei Diagnosestellung feststellen. Für die einzelnen Allele machten sie keine Angaben. Allerdings beschrieben sie ein erhöhtes NZK-Risiko bei den unter 65-Jährigen mit G/G-Genotyp. Sie schlossen daraus, dass der SNP309 eventuell doch eine Rolle beim frühen NZK spielen könnte.

Um den Einfluss des SNP309 auf das Erkrankungsalter zu ermitteln, wurden die Patienten dieser Arbeit in drei Altersgruppen eingeteilt. Es wurden bewusst viele

junge Patienten < 45 Jahren untersucht, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob junge Personen aufgrund eines bestimmten Genotyps erkranken.

In der Gruppe der über 75-Jährigen fand sich eine deutlich geringere Anzahl von G/G-Trägern als in den anderen beiden Altersgruppen, hier war auch der Anteil der G-Allel-Träger am geringsten. Dagegen waren die meisten G-Allel-Träger in der Gruppe der unter 45-Jährigen zu finden. Der Verdacht lag nahe, dass der G/G-Genotyp mit einem verfrühten Erkranken in Verbindung stehen könnte, was sich aber statistisch nicht erhärtete. Auch bei der Untersuchung der Allele zeigte sich kein Zusammenhang mit dem Erkrankungsbeginn. Es ließ sich also nicht nachweisen, dass der G/G-Genotyp oder das G-Allel an sich beim NZK von Europäern zu einem früheren Tumoraufreten führt.

Der Einfluss des Geschlechts auf die Tumorentstehung ist ein interessantes Gebiet der Tumorforschung. In dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen dem SNP309 im MDM2-Gen und einer erhöhten Anfälligkeit eines bestimmten Geschlechts für das NZK hergestellt werden.

Zwar lag der Verdacht nahe, dass das G-Allel bei Frauen eher einen Einfluss auf die NZK-Entstehung haben könnte, da die Reihenfolge der Genotypen in absteigender Häufigkeit bei Frauen $G/T > T/T > G/G$ und bei Männern $T/T > G/T > G/G$ war und das Vorkommen des G-Allels insgesamt bei den erkrankten Frauen erkennbar über dem der Männer lag. Doch waren diese Beobachtungen nicht signifikant. Alle drei Altersgruppen wurden noch einmal nach Geschlechtern getrennt auf ihre Genotypenverteilung untersucht. Auch hier zeigten sich aber keine signifikanten Unterschiede.

Unterstützung erfährt das Ergebnis dieser Arbeit durch Uchida et al. (2002), die beim Nierenzellkarzinom keinen Zusammenhang zwischen MDM2-Überexpression und dem Geschlecht fanden. Eine MDM2-Überexpression kann ein indirektes Zeichen für das Vorliegen des G-Allels an der Promotor-Position 309 sein. Hirata et al. (2007) machten leider keine Angaben zu dem Zusammenhang zwischen SNP309-Genotyp und der Anfälligkeit der einzelnen Geschlechter in ihrer NZK-Studie.

Damit steht das Ergebnis beim NZK in der europäischen Bevölkerung im Widerspruch zu den von Bond et al. (2006) veröffentlichten Daten. Sie bescheinigten weiblichen Patienten mit G-Allel einen früheren Erkrankungsbeginn. Der Gegensatz der Ergebnisse von Bond et al. (2006) zu den Erkenntnissen dieser Arbeit mag

seinen Ursprung in der Zusammensetzung oder Größe des Patientenkollektivs haben. Es wurden 123 Männer und 87 Frauen auf ihren SNP309-Genotyp untersucht. Die Zahl der Frauen ist um fast 1/3 geringer als die der Männer, jedoch findet die Gruppengröße in der statistischen Berechnung Beachtung.

Um eine Aussage über das Überleben der an dieser Studie beteiligten Patienten und ihren SNP309-Genotyp machen zu können, wurde der postoperative Verlauf der Patienten verfolgt. Der größte Teil der Patienten lebte zum Zeitpunkt der Erhebung der Studiendaten noch, so dass nur eine sehr geringe Anzahl an Todesfällen für die hier aufgestellte Statistik zum Überleben beim NZK zur Verfügung stand.

Tabelle 31 zeigt die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) für die Fälle dieser Arbeit. Sie lag über 20 % höher als die aus Literaturangaben (64 %; Jemal et al., 2006). Als Erklärung kann die hohe Zahl an zensierten Fällen herangezogen werden, aber auch die prognostisch günstige Ausgangssituation der Patienten bezüglich Tumorstadium, Differenzierungsgrad und Alter. Es kommt hinzu, dass ein Viertel aller Tumorfälle dieser Arbeit vom chromophoben Subtyp waren. Die chromophoben Karzinome haben eine langsame Progression und die beste Prognose der drei Hauptsubtypen (Amin et al., 2002). Als ungünstiger prognostischer Faktor dagegen gilt das sarkomatoide Erscheinungsbild eines NZK (Knight et al., 2007). Da in dieser Arbeit aber deutlich weniger als 2 % aller Tumoren dieses Bild zeigten, hatte es keine Auswirkungen auf das statistische Überleben. Die große Anzahl der Patienten ohne verfügbare klinische Daten (fast 50 %) könnte ebenfalls einen Grund für die geringe Aussagekraft der Überlebensstatistik darstellen. Vielen Patientenverläufen konnte nicht nachgegangen werden, z.B. wegen Umzugs oder Arztwechsels, oder weil der behandelnde Arzt keine Auskunft über den Patienten gab.

	Literaturangaben	Eigenes Ergebnis			
	gesamt	gesamt	G/G	G/T	T/T
5-JÜR	64 %	87,3 %	88,9 %	85,8 %	87,1 %

Tab. 31: 5-JÜR der Fälle dieser Arbeit im Vergleich mit Literaturangaben (Jemal et al., 2006)

Die Auswertung war wegen der geringen Fallzahl eher unsicher. Insgesamt konnte keine Verbindung zwischen dem SNP309-Genotyp und dem Überleben gefunden werden. Moch et al. (1997) unterstützen das Ergebnis dieser Arbeit. Sie stellten dar, dass die MDM2-Überexpression keine prognostische Information besitzt und keine Assoziation zum Überleben erkennbar ist. Zu dem gleichen Ergebnis kamen Uchida et al. (2002). Hirata et al. (2007) dagegen fanden einen Zusammenhang zwischen dem G/G-Genotyp und einer schlechten Prognose für die NZK-Patienten.

Da der chromophobe Subtyp aufgrund seines seltenen Vorkommens in Studien kaum Berücksichtigung findet, war es das Ziel bei der Auswahl der in dieser Arbeit zu analysierenden Fälle, einen möglichst großen Anteil chromophober Karzinome zu erhalten. Das chromophobe NZK ist wegen seiner vermuteten Verwandtschaft zum Onkozytom besonders interessant zu betrachten (Sorbellini et al., 2005). Es besteht der Verdacht einer Adenom-Karzinom-Sequenz vom Onkozytom zum chromophoben Karzinom, bedingt durch Zunahme genetischer Alterationen (siehe Kapitel 1.1.3.1; Störkel et al., 1999). Auf dieser Annahme aufbauend, könnte man bei beiden Tumoren eine ähnliche Verteilung der SNP309-Genotypen vermuten. Leider war aufgrund der geringen Anzahl von Onkozytomen (4) in dieser Studie dazu keine Aussage möglich. Auch Sammelrohrkarzinome, spindelzellige und undifferenzierte NZK sowie Tumoren mit gleichzeitigem Vorliegen verschiedener Subtypen wurden wegen ihrer geringen Fallzahlen und der damit verbundenen mangelnden Aussagekraft nicht mit aufgeführt.

Sowohl hellzelliges als auch chromophobes NZK waren am stärksten durch den G/T-Genotyp des SNP309 vertreten. Die Fälle vom papillären Typ waren zu 50 % homozygot für T. Eine Signifikanz für diese Beobachtung konnte aber nicht errechnet werden; eine Korrelation zwischen dem SNP309 und den Subtypen des NZK fehlte. Hirata et al. (2007) untersuchten diesen Zusammenhang nicht. Aber auch für andere Tumoren, bei denen verschiedene Subtypen unterschieden werden können, wurde keine Assoziation der einzelnen Untergruppen mit dem SNP309 des MDM2-Gens gefunden (Bond et al., 2005).

Es soll noch der Zusammenhang von SNP309-Ausprägung und histopathologischen Merkmalen genauer betrachtet werden. In dieser Arbeit konnte keine Korrelation zwischen dem SNP309 und den histopathologischen Daten des Patientenkollektivs

nachgewiesen werde. Dieses Ergebnis reiht sich nahtlos in bereits bestehende Erkenntnisse ein. Aus früheren Studien über das Nierenzellkarzinom weiß man, dass zwischen einer Überexpression von MDM2 und Tumorstadien bzw. Differenzierungsgrad keine Assoziation besteht (Haitel et al., 2000; Uchida et al., 2002). Für andere Tumoren konnte auch keine Assoziation dieser Parameter festgestellt werden (Bond et al., 2005; Alhopuro et al., 2005). Bisher ist noch kein Tumor in der Literatur beschrieben, bei dem eine Verbindung zwischen der Histopathologie und dem SNP309-Genotyp bekannt wäre.

5.2 Verifizierung der Ergebnisse

Es existieren Grenzen bei der isolierten Betrachtung eines einzigen SNPs in einem Signalweg; es muss immer auch in Betracht gezogen werden, dass andere SNPs, Gene und Umweltfaktoren zu den erzielten Ergebnissen beitragen könnten. Im Falle des MDM2-Gens ist beispielsweise noch ein weiterer Polymorphismus in der Promotorregion an der Stelle 344 bekannt. Dieser SNP344 (T → A) kommt aber nur selten vor (im heterozygoten Zustand tragen ihn 8 % der Menschen) und ist deshalb nicht untersucht (Bond et al., 2004).

Studien wie diese, die eine Verbindung zwischen einem molekularen Mechanismus und einem klinischen Effekt herzustellen versuchen, gelangen häufig zu unterschiedlichen Ergebnissen. Verschiedene Gründe können dafür verantwortlich sein:

- Unterschiede in den Methoden, sowohl labortechnische als auch statistische
- Größe und Zusammenstellung des Patientenkollektivs
- Geographische und ethnische Differenzen

Methodische Ursachen können als Gründe für die Ergebnisse dieser Arbeit ausgeschlossen werden. Die Amplifizierung der DNA durch PCR wurde überprüft und funktionierte einwandfrei, auch die anschließende Auswertung der PCR-Produkte durch Gelelektrophorese war sicher und lieferte eindeutige Ergebnisse. Ebenso zweifellose Ergebnisse wurden mittels Fragmentanalyse erzielt. Zur Bestätigung der sicheren Auswertung wurde zusätzlich eine Sequenzierung des betrachteten DNA-Abschnittes durchgeführt.

Bezüglich der Methodik wurden in dieser Arbeit und in der von Hirata et al. (2007) ähnliche Verfahren angewandt. Die beiden Studien unterschieden sich aber in der Größe der Kollektive. Hirata et al. (2007) arbeiteten mit jeweils 200 Patienten und Kontrollpersonen, während in der vorliegenden Arbeit mit 235 Fällen eine etwas größere Anzahl analysiert wurde. Die Kontrollgruppe war mit 111 tumorfreien Personen allerdings deutlich kleiner. In diesen Differenzen kann eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse liegen. Manchmal sind Kohorten zu klein, um Unterschiede zwischen Patientenkollektiv und Kontrollgruppe feststellen zu können. Es wurde jedoch gezeigt, dass die Kontrollgruppe dieser Arbeit einem typischen europäischen Kontrollgruppenkollektiv entspricht. Sie enthält also keine Verzerrung. Daher können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit als valide angesehen werden. Bei einigen Aspekten musste bei der Auswertung der Daten lediglich beachtet werden, dass die Fallzahl nur gering und Schlussfolgerungen somit vorsichtig zu treffen waren.

Ein weiterer und wahrscheinlich der ausschlaggebende Punkt für die kontradikten Ergebnisse von Hirata et al. (2007) und der vorliegenden Arbeit ist der Unterschied in den ethnischen Voraussetzungen der beiden Studien. Sowohl die von Hirata et al. (2007) untersuchten Patienten als auch die Kontrollen waren ohne Ausnahme japanischer Abstammung, während in der vorliegenden Arbeit vor allem Europäer und wenige weiße US-Amerikaner das Patientenkollektiv und die Kontrollgruppe bildeten.

Atwal et al. (2007) erklärten, dass die SNP309-Häufigkeit und -Verteilung stark von der Zugehörigkeit zu einer ethnischen Gruppe sowie von der demographischen Geschichte abhängig ist. Die G-Allel-Häufigkeit bei Nordeuropäern beispielsweise wird mit 33 % angegeben, wogegen sie bei Amerikanern afrikanischer Herkunft bei nur 11 % liegt (Harris et al., 2005). Da der G-Allel-Haplotyp aber in beiden ethnischen Gruppen identisch ist, gingen Millikan et al. (2006) davon aus, dass Afrikaner ursprünglich kein G-Allel im SNP309 trugen und dieses nur aufgrund von Durchmischung mit Menschen weißer Hautfarbe auftritt. Diese Annahme deutet auf die Entstehung des G-Allels in der näheren menschlichen Evolution hin, genauer nach der initialen Migration der Menschheit aus Afrika.

Ein ähnlich unterschiedliches Vorkommen und eine vergleichbar divergente Entwicklungsgeschichte des G-Allels sind zwischen Japanern und Europäern

denkbar. Dies würde die voneinander abweichenden Forschungsergebnisse erklären.

Zur Verdeutlichung zeigen Tabelle 32 und Abbildung 29 die Unterschiede in der Verteilung der SNP309-Genotypen in verschiedenen ethnischen Gruppen. Während Europäer eine G/G-Häufigkeit von etwa 15 % aufweisen, tragen Afroamerikaner nur zu einem äußerst geringen Prozentsatz (2 %) diesen Genotyp. Japaner dagegen sind zu durchschnittlich etwa einem Viertel G/G-Träger. Es ist möglich, dass nicht nur die Genotypenverteilung in den Bevölkerungsgruppen eine andere ist, sondern auch die Rolle, die die SNP309-Ausprägung bei der Karzinomentstehung spielt.

Literatur	n	Ethnische Herkunft	G/G	G/T	T/T
Hirata et al., (2007)	200	Japaner	20,0 %	49,0 %	31,0 %
Dhareel et al., 2006	48	Japaner	27,0 %	54,0 %	19,0 %
Millikan et al., (2006)	680	Afroamerikaner	2,0 %	18 %	80 %
Pine et al., (2006)	255	Afroamerikaner	2,0 %	18,4 %	79,6 %
Alhopuro et al. (2005)	185	Europäer	16,0 %	53,0 %	31,0 %
Eigene Ergebnisse	111	Europäer	15,3 %	53,2 %	31,5 %

Tab. 32: Verteilung der Genotypen in der Normalbevölkerung unterschiedlicher ethnischer Gruppen

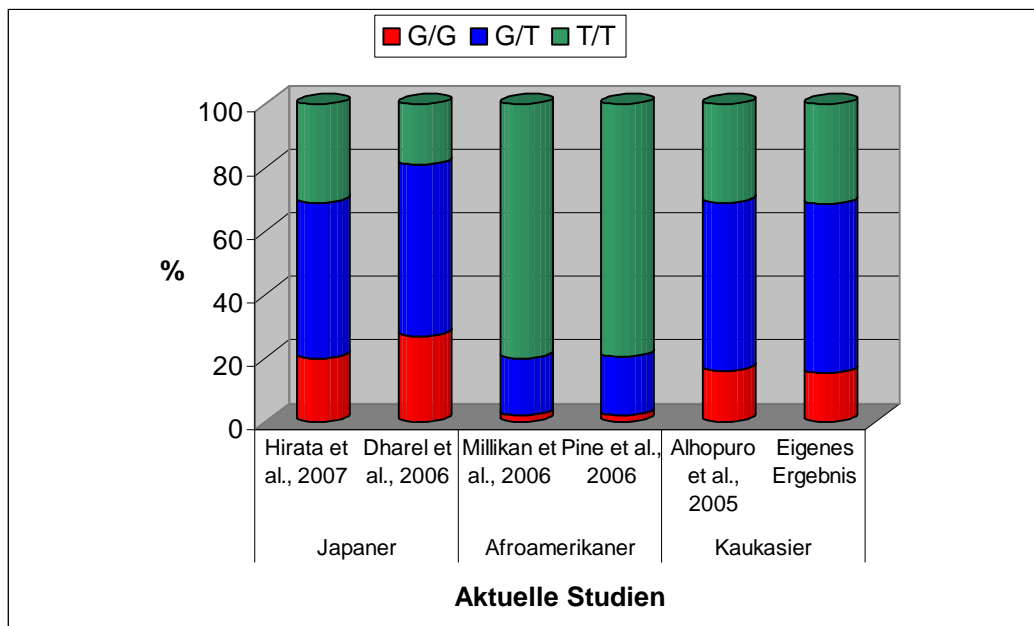


Abb. 29: Graphische Darstellung der Genotypenverteilung in unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen

5.3 Vergleich mit anderen Tumorerkrankungen

Die Niere ist nicht das einzige Gewebe mit Tumorbildung, bei dem bezüglich des SNP309 kein Unterschied zwischen dem Patientenkollektiv und der Kontrollgruppe festgestellt wurde. Weder bei Bindegewebstumoren (Bond et al., 2005) noch bei Brustkrebs oder Kolorektalen Karzinomen (Wilkening et al., 2007) wurde ein Einfluss des G-Allels auf das Tumorrisiko nachgewiesen. Wilkening et al. (2007) haben in einer Metaanalyse die Ergebnisse vieler Studien kombiniert und ausgewertet, die unterschiedliche Tumoren auf ihren SNP309-Genotyp untersucht hatten. Sie kamen zu dem Schluss, dass der SNP309 an sich nur wenig oder gar keinen Effekt auf das Tumorrisiko hat. Er könnte aber das Erkrankungsalter und die Prognose beeinflussen.

Der Einfluss des SNP309-Genotyps auf den Erkrankungsbeginn und das Überleben für andere Tumoren wird kontrovers diskutiert. Einige Studien konnten keinen Zusammenhang zwischen dem SNP309-Genotyp und einem niedrigen Tumorerkrankungsalter (Millikan et al., 2006; Alhopuro et al., 2005; Pine et al., 2006) oder dem Überleben feststellen (Bond et al., 2005). Andere dagegen vertraten die Meinung, dass das Vorliegen des G/G-Genotyps zu einem früheren Erkrankungsbeginn (Bond et al. 2005; Campbell et al., 2005; Alazzouzi et al., 2007)

bzw. einer schlechteren Prognose führt (Onel et al., 2004; Ohmiya et al., 2006; Hong et al., 2005).

5.4 Einordnung des SNP309 in den Gesamtkontext

Tumorentstehung ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren. Als Teil des p53-Signalweges ist der MDM2-SNP309 einer davon (Abb. 30).

Bond et al. (2005) schlugen vor, dass durch Zellstress verursachte und im Zellalltag völlig normale Mutationen bei Vorhandensein der Basen G oder T gleichermaßen auftreten. Durch den Wildtyp T und den sich anschließenden funktionsfähigen p53-Signalweg würden die Mutationen aber wieder ausgemerzt werden, während sie in einer Zelle mit dem G-Genotyp aufgrund des herunterregulierten p53-Signalweges bestehen blieben, weitere Zellteilungen durchlaufen und somit zur Tumorgenese führen könnten. Die Interaktion des SNP309 mit den anderen Komponenten des p53-Signalweges und sein Einfluss auf die Tumorgenese soll im Folgenden diskutiert werden.

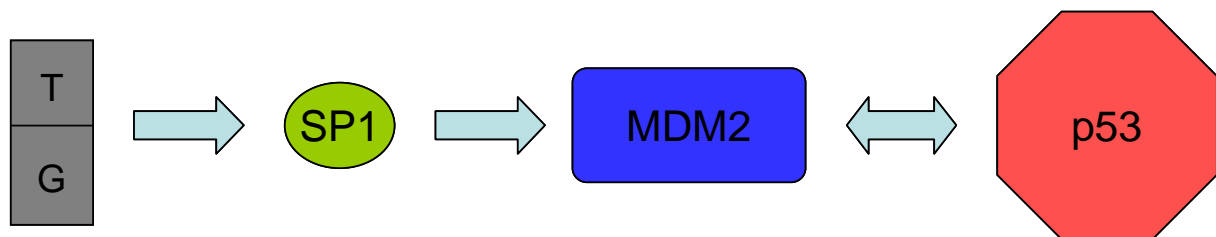


Abb. 30: Grober Ausschnitt aus dem p53-Signalweg

Unter der Annahme, dass der G/G-Genotyp des SNP309 zu einer erhöhten MDM2-Konzentration führt, prüften Bond et al. (2004) die Rolle des Transkriptionsfaktors SP1. Sie inhibierten das endogene SP1. Eine Hemmung von SP1 ist zum Beispiel durch Mithramycin A möglich, welches selektiv die durch SP1 vermittelte transkriptionale Aktivität inhibiert (Blume et al., 1991). Es zeigte sich, dass die SP1-Reduktion zu einer deutlichen MDM2-Senkung in Zellen mit dem G/G-Genotyp führte. In SNP-Wildtyp Zellen dagegen hatte die SP1-Hemmung keinerlei Effekt auf die MDM2-Konzentration. Dies beweist den Einfluss von SP1, den es vor allem in G/G-Zellen auf den MDM2-Spiegel haben kann.

SP1-Level und -Aktivität sind aber nicht in allen menschlichen Zellen und Gewebetypen gleich hoch. Deshalb ist ein gewebespezifischer Effekt eines ererbten und in allen Zellen des Körpers vorliegenden SNPs denkbar (Venter et al., 2001). Das würde erklären, warum das Tumorrisiko mit dem G-Allel im SNP309 in einigen Geweben steigt (Bond et al., 2005) und in anderen wie möglicherweise der Niere nicht. Denn wenn im Nierengewebe ein niedriger Gehalt an SP1 oder eine geringe SP1-Aktivität vorläge, zöge dies, wie oben gezeigt, eine vernachlässigbar geringe MDM2-Expression nach sich. Ob die Niere tatsächlich ein SP1-armes Organ ist, ließe sich in weiteren Studien untersuchen.

Das MDM2-Molekül nimmt eine Art Schlüsselrolle im p53-Signalweg ein, da es durch negative Rückkopplung direkt mit p53 in Verbindung steht. Wenn man aber das MDM2-Molekül getrennt von den anderen Mitspielern im Signalweg betrachtet, wird deutlich, dass die Transkription des MDM2-Gens nicht zwangsläufig mit dem Vorliegen des p53-aktiven MDM2-Proteins einhergehen muss. Es existieren mehr als 40 verschiedene Varianten für das Transkriptionsprodukt des MDM2-Gens (Ganguli et al., 2003). Sie kommen durch verschiedene Transkriptionsstarts und alternatives oder aberrantes Spleißen zustande. Die Rolle dieser Varianten ist noch weitgehend unverstanden. Zahlreichen Transkripten fehlt die p53-Bindedomäne zumindest teilweise und es wird spekuliert, dass der Verlust der p53-Bindefähigkeit zu einer Akkumulation von p53 in der Zelle führen kann. Auch eine direkte Bindung an gleichzeitig exprimiertes, vollständiges MDM2, die zu Inaktivierung führt, wird diskutiert (Bartel et al., 2004).

MDM2 führt in 10 % aller menschlichen Tumoren zu einer Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 (Ganguli et al., 2003). Das heißt, dass in der Mehrzahl aller Tumoren p53 durch einen anderen Mechanismus inaktiviert wird. Dies wirft zusammen mit den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen die Frage auf, ob nicht die Möglichkeit besteht, dass MDM2 eher irrelevant für die Tumortransformation von Zellen ist (Ganguli et al., 2003).

Gurova et al. (2004) formulierten die Annahme, dass die p53-Funktion in Zellen des Nierenzellkarzinoms von einem noch unbekannten, MDM2-unabhängigen dominanten Mechanismus eingeschränkt wird. Verschiedene Studien hatten herausgefunden, dass im Gegensatz zu vielen anderen Tumoren beim NZK nur

selten Mutationen im p53-Tumorsuppressorgen vorliegen (Tomasino et al., 1994; Hofmockel et al., 1996; Sejima et al., 1999). Dennoch war auch in der Mehrzahl dieser Tumoren eine p53-Inaktivierung vorhanden. Auf Zellstress reagierten die NZK-Zellen mit Wildtyp-p53 zwar erwartungsgemäß mit Akkumulation, nukleärer Translokation und Bindung an die DNA, es folgte aber nicht die nötige erhöhte Transkriptionsrate. Gurova et al. (2004) folgerten, dass nicht eine Mutation, sondern ein anderer Mechanismus dafür verantwortlich sein musste. Untersuchungen führten zu der Erkenntnis, dass es weder MDM2 noch einer der anderen bekannten p53-Regulatoren war, die den Defekt in der p53-Funktion verursachten. Somit liegt die Vermutung nahe, dass tatsächlich ein noch unbekannter, eventuell gewebespezifischer Vorgang zu der p53-Einschränkung beim Nierenzellkarzinom führt.

Der Einfluss vieler teils noch unbekannter Faktoren auf die Komponenten des p53-Signalwegs zeigt sich ganz deutlich. Deshalb erscheint es interessant, einen weiteren Polymorphismus zu betrachten. Es handelt sich um einen SNP im Codon 72 des p53-Tumorsuppressorgens, der zu einem Austausch der Aminosäure Prolin gegen Arginin (p53-Pro und p53-Arg) führt (Sullivan et al., 2004). P53-Pro wirkt sowohl bei der Unterdrückung zellulärer Transformation als auch bei der Apoptoseeinleitung weniger effizient als die p53-Arg-Variante (Thomas et al., 1999; Dumont et al., 2003). Durch diese Eigenschaften kann p53-Pro mit einer früheren Tumorerkrankung und einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht werden (Sullivan et al., 2004).

Verschiedene Forschungsgruppen untersuchten den Effekt, den ein kombiniertes Vorliegen von G-Allel und p53-Arg-Variante auf eine Zelle hat (Hirata et al, 2007; Bougeard et al, 2006; Atwal et al., 2007). Bougeard et al. (2006) stellten einen kumulativen Effekt auf das Erkrankungsalter fest. Träger von G- und p53-Arg-Allel erkrankten deutlich früher als die mit T- und p53-Pro-Allel. Im Fall des Nierenzellkarzinoms konnten Hirata et al. (2007) diesen Effekt nicht bestätigen. Sie stellten keinen sich addierenden Zusammenhang zwischen den beiden Polymorphismen fest.

Manche Forschungsgruppen plädieren dafür, dass eine gleichzeitig vorliegende p53/MDM2-Überexpression, unabhängig von ihren SNPs, einen Einfluss auf das

Überleben beim NZK hat (Haitel et al., 2000; Uchida et al., 2002). Eine p53-Überexpression ist unter anderem auf mutiertes p53 zurückzuführen. Mutiertes p53 in Tumorzellen ist stabil, weil eine Transaktivierung mit MDM2 nicht mehr möglich ist. Es resultiert ein defekter Rückkopplungskreislauf (Weinberg, 2007). Das reduzierte Zusammenspiel von MDM2 und mutiertem p53 erklärt auch die Beobachtung von Menin et al. (2006). Sie zeigten einen signifikanten Einfluss des SNP309 auf den Erkrankungsbeginn nur bei Wildtyp-p53, nicht bei einer mutierten Form des Proteins. In der vorliegenden Studie wurde keine Prüfung auf p53-Mutationen vorgenommen. Daher kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die mangelnde Einflussnahme des G-Allels und des MDM2-Spiegels auf die Inzidenz und das Erkrankungsalter beim NZK mit einer solchen Mutation zu begründen sein könnte.

Bei anderen sporadisch auftretenden Tumoren ist bekannt, dass der hier untersuchte Polymorphismus im MDM2-Gen einen Einfluss auf die unterschiedliche Anfälligkeit von Männern und Frauen für Tumoren hat (Bond et al., 2006; Alhopuro et al., 2005). Zur Erklärung einer beobachteten Geschlechterdifferenz bei Tumoren wird vielfach der sich unterscheidende weibliche und männliche Hormonhaushalt herangezogen. Im Fall des hier betrachteten Einzelnukleotid-Polymorphismus ist eine Verbindung zu hormonellen Signalwegen durchaus denkbar. Der SNP309 liegt in einer Region des MDM2-Promotors, die gleichzeitig Teil eines Östrogen-signalwegs ist. Es wurde gezeigt, dass der Östrogenrezeptor ER α die Transkription von MDM2 durch Bindung an dessen Promotor induziert (Phelps et al., 2003; Kinyamu et al., 2003).

Der SNP309 könnte die transkriptionelle Regulation von MDM2 durch Hormonrezeptoren insofern beeinflussen, als dass das G-Allel die Bindungsaffinität zu SP1 erhöht. Das *stimulatory protein 1* ist ein Co-Transkriptionsfaktor für nukleäre Hormonrezeptoren wie den Östrogenrezeptor ER α (Khan et al., 2003). Das Zusammenwirken dieser drei Komponenten (G-Allel, SP1 und ER α) könnte zu einer stark gesteigerten MDM2-Expression führen, die eine Herabregulation des p53-Signalweges nachsichzieht und eine Tumorentstehung begünstigt.

Bond et al. (2006) untersuchten, ob der SNP309-Genotyp die Effekte von Hormonen wie Östrogen auf die Tumorgenese verändert und so zu Geschlechtsunterschieden bei Tumoren beiträgt. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass ein aktiver Östrogen-Signalweg in Kombination mit dem G-Allel am SNP309 entweder direkt oder indirekt zu einer beschleunigten Tumorbildung bei Frauen führt.

Es ist allerdings zu bedenken, dass Mütter (Multipara) gegenüber kinderlosen Frauen (Nullipara) ein um 40% erhöhtes Risiko haben, an NZK zu erkranken (Lambe et al., 2002). Dies könnte auf die hormonellen Veränderungen zurückzuführen sein, die mit einer Schwangerschaft assoziiert sind und vor allem den Östrogenhaushalt betreffen. Diese östrogenbedingte Risikosteigerung scheint für Frauen also auch SNP309-unabhängig zu bestehen.

In den Östrogensignalweg wird bei Menschen aus unterschiedlichsten Gründen häufig eingegriffen. Kontrazeption, Behandlung menopausaler Beschwerden und Krebsprävention und -therapie sind nur einige der medizinischen Felder, in denen östrogenhaltige Hormonpräparate eingesetzt werden. Eine solche Manipulation am natürlichen Östrogenhaushalt könnte Krebsrisiko und -progression ändern (Osborne, 1998; Dietel et al., 2005; Gago-Dominguez et al. 1999). Ob der kanzerogene Einfluss dieser Hormone wirklich über den SNP309 vermittelt wird, bleibt fraglich.

5.5 Ausblick

Nach eingehender Auseinandersetzung mit allen Aspekten der Tumorentstehung im Zusammenhang mit dem SNP309 bleibt die Überzeugung, dass beim Nierenzellkarzinom der Europäer keine Risikoerhöhung aufgrund des G/G-Genotyps im MDM2-Gen gegeben ist. Diese Arbeit ist die bisher größte Studie für das NZK zu diesem Thema. Es wäre wünschenswert, dass die Ergebnisse in Zukunft durch noch größere Kollektive bestätigt würden.

Die Kenntnis der genetischen Grundlagen des NZK ist wichtig für den klinischen Umgang mit dieser Tumorerkrankung. Daher muss nach anderen genetischen Variablen (Genen oder SNPs) gesucht werden, die für das NZK von Bedeutung sein könnten. Im Vordergrund sollten dabei zunächst stehen:

- der erwähnte p53-Pro/Arg-Polymorphismus; eine Studie darüber ist bereits in Planung (Hammerschmied et al.)
- die Gene der p53-Superfamilie (p63 und p73), die für p53-interferierende Proteine codieren
- die Rolle eines mutierten p53 im Zusammenhang mit dem SNP309; zu diesem Thema scheinen noch einige Unklarheiten zu bestehen
- die Frage, ob die Niere ein SP1-armes Organ ist

Ein genaues Wissen über die Rolle des SNP309 oder anderer Faktoren im p53-Signalweg und ihren Einfluss auf die Entstehung des NZK hätte bedeutende Auswirkungen auf Planung und Durchführung von Vorsorgeuntersuchungen; auch deshalb, weil eventuell Aussagen zur Empfänglichkeit einer Person für Krebserkrankungen getroffen werden könnten. Zusätzlich wäre es denkbar, das wahrscheinliche Erkrankungsalter voraussagen zu können.

Vielversprechend sind vor allem die Aussichten hinsichtlich des therapeutischen Nutzens. Chemo- und Radiotherapien sind oftmals darauf angelegt, das Genom der Tumorzellen zu schädigen, um den programmierten Zelltod zu provozieren. Eine abgeschwächte p53-Funktion führt zu einem deutlich geringeren Ansprechen auf diese Therapieformen (Weinberg, 2007). Geht man davon aus, dass die p53-Funktion beim NZK durch einen inhibierenden Faktor vermindert ist, wäre die Herstellung von Molekülen, die mit diesem interferieren, eine therapeutische Option. Es kann nämlich angenommen werden, dass die Wiederherstellung der p53-Aktivität zu einem direkten Absterben der Tumorzelle führt oder sie zumindest für eine Behandlung sensibilisiert (Gurova et al., 2004).

Die Entwicklung gezielter Therapien wird ebenfalls durch die Aufklärung am Tumorwachstum beteiligter Wachstumsmechanismen ermöglicht. Ein therapeutischer Ansatzpunkt ist beispielsweise der Eingriff in die Tumor-Angiogenese mit Bevacizumab, einem rekombinanten monoklonalen Antikörper gegen VEGF (*Vascular endothelial growth factor*; Yang et al., 2003).

Die Identifizierung verlässlicher prädiktiver Faktoren bei Tumorerkrankungen ist unerlässlich. Dieses Ziel könnte zukünftig erreicht werden, indem altbewährte histopathologische mit neuen klinischen und molekularen Prognosefaktoren, wie gegebenenfalls dem SNP309, kombiniert werden. Eine solche Systematik stellen beispielsweise das *University of California Los Angeles Integrated Staging System* (UISS) oder das *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* (MSKCC) *nomogram* dar (Knight et al., 2007).

6 Zusammenfassung

Das *mouse double minutes 2*-Protein (MDM2) ist der zelluläre Hauptregulator des Tumorsuppressors p53, eines Transkriptionsaktivators von DNA-Reparatur- und Apoptosegenen, dessen Funktion von intakten Zellen nicht benötigt wird. MDM2 führt p53 über Ubiquitinierung dem proteasomalen Abbau zu. Im Falle einer DNA-Schädigung wird die Bildung des MDM2/p53-Komplexes durch Phosphorylierung von p53 unterbunden. Auf diese Weise wird p53 freigesetzt und steht der Zelle sofort zur Einleitung von Reparatur- bzw. Apoptoseprozessen zur Verfügung.

Von MDM2 ist ein *single nucleotide polymorphism* (SNP) in der Promoterregion von Intron 1 bekannt, der zu einer erhöhten Affinität des Transkriptionsaktivators SP1 führt. Bindet SP1 an den Promotor, resultiert eine erhöhte MDM2-Expression, der p53-Signalweg wird herunterreguliert. Es konnte nachgewiesen werden, dass dieser SNP an Position 309 (Austausch der Base T durch G) mit vermehrter Tumorbildung bei erblichen, aber auch sporadischen Krebserkrankungen einhergeht. Darüber hinaus konnte für einige Tumoren ein früheres Erkrankungsalter bei Patienten mit dem SNP gezeigt werden. Bislang liegen noch keine Daten zum sporadischen Nierenzellkarzinom (NZK) bei Europäern vor.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Verteilung der Genotypen des MDM2-SNP309 innerhalb einer Gruppe von 257 überwiegend europäischen Patienten mit Nierenzellkarzinom ermittelt (101 hellzellige, 32 papilläre und 102 chromophobe NZK) und mit der einer Kontrollgruppe ohne Tumorerkrankung (111 Proben) verglichen. Die DNA wurde aus den formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Normalgewebeproben extrahiert. Die Amplifizierung des Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) erfolgte mittels PCR unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide. Für den sich anschließenden Verdau wurde das Restriktionsenzym MspA1 verwendet. Danach erfolgte die Kapillarelektrophorese. Der Vergleich der Verteilung der Genotypen beider Gruppen erfolgte anhand des Exakten Tests nach Fisher. Zusätzlich wurde die Korrelation des Polymorphismus mit NZK-Subtypen, histopathologischen Kriterien, Alter, Geschlecht und Überleben untersucht. Die Analyse der Überlebensdaten wurde mit dem Log Rank Test durchgeführt.

Die Verteilung der Genotypen von Patienten mit Nierenzellkarzinom unterschied sich nicht wesentlich von der der Kontrollgruppe. Es war ebenfalls keine Korrelation zwischen dem Genotyp und dem NZK-Subtyp, Erkrankungsalter, Geschlecht, Überleben oder den histopathologischen Parametern erkenntlich. Auch bezüglich der Allelverteilung ergab sich keine Korrelation.

So kommt diese Arbeit zu dem Schluss, dass das Vorkommen des SNP an der Position 309 des MDM2-Gens keinen Einfluss auf ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für das Nierenzellkarzinom hat. Es liegt ebenfalls kein Zusammenhang zwischen dem SNP und einem besonders niedrigen Erkrankungsalter, dem Tumorstadium oder -subtyp, dem Geschlecht und dem Überleben bei europäischen Nierenzellkarzinom-Patienten vor.

7 Literaturverzeichnis

- **Alazzouzi, H.;** Suriano, G.; Guerra, A.; Plaja, A.; Espín, E.; Armengol, M.; Alhopuro, P.; Velho, S.; Shinomura, Y.; González-Aguilera, J.J.; Yamamoto, H.; Aaltonen, L.A.; Moreno, V.; Capellà, G.; Peinado, M.A.; Seruca, R.; Arango, D.; Schwartz, S. (2007): Tumour selection advantage of non-dominant negative p53 mutations in homozygotic MDM2-SNP309 colorectal cancer cells. J Med Genet, 44: 75-80
- **Alhopuro, P.;** Ylisaukko-Oja, S.K.; Koskinen, W.J.; et al. (2005): The MDM2 promoter polymorphism SNP309T→ G and the risk of uterine leiomyosarcoma, colorectal cancer, and squamous cell carcinoma of the head and neck. J Med Genet, 42: 694-698
- **Amato, R.J. (2000):** Chemotherapy for renal cell carcinoma. Semin Oncol, 27: 177-186
- **Amin, M.B.;** Amin, M.B.; Tamboli, P.; et al. (2002): Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: an experience of 405 cases. Am J Surg Pathol, 26: 281-291
- **Applied Biosystems (2002):** ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer – User Reference Guide. Applied Biosystems, USA
- **Atwal, G.,S.;** Bond, G.L.; Metsuyanin, S.; Papa, M.; Friedman, E.; Distelman-Menachem, T.; Asher, E.B.; Lancet, D.; Ross, D.A.; Sninsky, J.; White, T.J.; Levine, A.J.; Yarden, R. (2007): Haplotype structure and selection of the MDM2 oncogene in humans. Proc Natl Acad Sci USA, 104: 4524-4529
- **AWMF-Leitlinien der deutschen Röntgengesellschaft zur Bildgebenden Diagnostik (2003):** Nierenzellkarzinom. AWMF-Leitlinienregister Nr 039/078, AWMF online (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften)
- **Bartel, F.;** Harris, L.C.; Würfl, P.; Taubert, H. (2004): MDM2 and its splice variant messenger RNAs: expression in tumors and down-regulation using antisense oligonucleotides. Mol Cancer Res, 2: 29-35
- **Bassil, B.;** Dosoretz, D.E.; Prout, Jr. G.R. (1985): Validation of the tumor, nodes and metastasis classification of renal cell carcinoma. J Urol, 134: 450-454

- **Bergstrom, A.**; Hsieh, C. C.; Lindblad, P.; Lu, C. M.; Cook, N. R.; Wolk, A. (2001): Obesity and renal cell cancer—a quantitative review. *Br J Cancer*, 85: 984
- **Blume, S.W.**; Snyder, R.C.; Ray, R.; Thomas, S.; Koller, S.A.; Miller, D.M. (1991): Mithramycin inhibits SP1 binding and selectively inhibits transcriptional activity of the dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. *J Clin Invest*, 88: 1613-1621
- **Bond, G.L.**; Hirshfield, K.M.; Kirchhoff, T.; Alexe, G.; Bond, E.E.; Robins, H.; Bartel, F.; Taubert, H.; Wuerl, P.; Hait, W.; Toppmeyer, D.; Offit, K.; Levine, A.J. (2006): MDM2 SNP309 accelerates tumor formation in a gender-specific and hormone-dependent manner. *Cancer Res*, 66: 5104- 5104
- **Bond, G.L.**; Hu, W.; Bond, E.E.; Robins, H.; Lutzker, S.G.; Arva, N.C.; Bargonetti, J.; Bartel, F.; Taubert, H.; Wuerl, P.; Onel, K.; Yip, L.; Hwang, S.; Strong, L.C.; Lozano, G.; Levine, A.J. (2004): A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 Tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*, 119: 591-602
- **Bond, G.L.**; Hu, W.; Levine, A. (2005): A single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene: From a molecular and cellular explanation to clinical effect. *Cancer Res*, 65: 5481-5484
- **Botstein, D.**; Risch, N. (2003): Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for Mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet*, 33: 228-237
- **Bougeard, G.**; Baert-Desurmont, S.; Tournier, I.; Vasseur, S.; Martin, C.; Brugieres, L.; Chompret, A.; Bressac-de Paillerets, B.; Stoppa-Lyonnet, D.; Bonaiti-Pellie, C.; Frebourg, T. (2006): Impact of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphism on age of tumour onset in Li-Fraumeni syndrome. *J Med Genet*, 43: 531-533
- **Cahill, D.P.**; Lengauer, C.; Yu, J.; Riggins, G.J.; Willson, J.K.V.; Markowitz, S.D.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. (1998): Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature*, 392: 300-303
- **Calle, E. E.**; Kaaks, R. (2004): Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev*, 4: 579

- **Campbell, I.G.**; Eccles, D.M.; Choong, D.Y.H. (2005): No association of the MDM2 SNP309 polymorphism with risk of breast or ovarian cancer. *Cancer Letters*, 240: 195-197
- **Campbell, S.C.**; Flanigan, R.C.; Clark, J.I. (2003): Nephrectomy in metastatic renal cell carcinoma. *Curr Treat Options Oncol*, 4: 363-72
- **Cheville, J.C.**; Lohse, C.M.; Zincke, H.; Weaver, A.L.; Blute, M.L. (2003): Comparisons of outcome and prognostic factors among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 27: 612-624
- **Chow, W.H.**; Devesa, S.S.; Warren, J.L.; Fraumeni, J.F., Jr. (1999): The rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA*, 281: 1628
- **Delahunt, B.**; Eble, J.N.; McCredie, M.R.; Bethwaite, P.B.; Stewart, J.H.; Bilous, A.M. (2001): Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: comparison of growth kinetics and patient survival in 66 cases. *Hum Pathol*, 32: 590-595
- **Dharel, N.**; Kato, N.; Muroyama, R.; Moriyama, M.; Shao, R.X.; Kawabe, T.; Omata, M. (2006): MDM2 promoter SNP309 is associated with the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Clin Cancer Res* 12: 4867-4871
- **Dietel, M.**; Lewis, M.A.; Shapiro, S. (2005): Hormone replacement therapy: pathobiological aspects of hormonesensitive cancers in women relevant to epidemiological studies on HRT: a mini-review. *Hum Reprod*, 20: 2052-2060
- **Drucker, B.J.** (2005): Renal cell carcinoma: Current status and future prospects. *Cancer treatment reviews*, 31: 536-545
- **Dumont, P.**; Leu, J.I.; Della Pietra, A.C. 3rd; George, D.L.; Murphy, M. (2003): The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet*, 33: 357-365
- **Eble, J.N.**; Sauter, G.; Epstein, J.I.; Sesterhenn, I.A. (Hrsg.) (2004): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. IARC Press, Lyon, pp. 10-45
- **El Galley, R.** (2003): Surgical management of renal tumors. *Radiol Clin North Am*, 41: 1053-1065
- **Erichsen, H.C.**; Chanock, S.J. (2004): SNPs in cancer research and treatment. *Br J Cancer*, 90: 747-751

- **Escudier, B (2008):** Signaling inhibitors in metastatic renal cell carcinoma. *The Cancer Journal*, 14: 325-329
- **Ficarra, V.;** Galfano, A.; Mancini, M; Martignoni, G.; Artbani, W. **(2007):** TNM staging system for renal-cell carcinoma: current status and future perspectives. *Lancet Oncol*, 8: 554-558
- **Frank, I.;** Blute, M.L.; Leibovich, B.C.; Cheville, J.C.; Lohse, C.M.; Zincke, H. **(2005):** Independent validation of the 2002 American Joint Committee on cancer primary tumor classification for renal cell carcinoma using a large, single institution cohort. *J Urol*, 173: 1889-1892
- **Furge, K.A.;** Lucas, K.A.; Takahashi, M.; Sugimura, J.; Kort, E.J.; Kanayama, H.; Kagawa, S.; Hoekstra, P.; Curry, J.; Yang, X.J.; Teh, B.T. **(2004):** Robust classification of renal cell carcinoma based on gene expression data and predicted cytogenetic profiles. *Cancer Res*, 64: 4117-4121
- **Furge, K.A.;** Tan, M.H.; Dykema, K.; Kort, E.; Stadler, W.; Yao, X.; Zhou, M.; Teh, B.T. **(2007):** Identification of deregulated oncogenic pathways in renal cell carcinoma: an integrated oncogenomic approach based on gene expression profiling. *Oncogene*, 26: 1346-1350
- **Gago-Dominguez, M.;** Castela, J. E.; Yuan, J. M.; Ross, R. K.; Yu, M. C. **(1999):** Increased risk of renal cell carcinoma subsequent to hysterectomy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 8: 999
- **Gago-Dominguez, M.;** Yuan, J.M.; Castela, J.E.; Ross, R.K.; Yu, M.C. **(2001):** Family history and risk of renal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10: 1001-1004.
- **Ganguli, G.;** Wasyluk, B. **(2003):** P53-independent functions of MDM2. *Mol Cancer Res*, 1: 1027-1035
- **Godley, P.A.;** Ataga, K.I. **(2000):** Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol*, 12: 260-264
- **Gospodarowicz, M.K.;** Miller, D.; Groome, P.A.; Greene, F.L.; Logan, P.A.; Sobin, L.H. **(2004):** The process for continuous improvement of the TNM classification. *Cancer*, 100: 1-5
- **Gurova, K.V.;** Hill, J.E.; Razorenova, O.V.; Chumakov, P.M.; Gudkov, A.V. **(2004):** P53 pathway in renal cell carcinoma is repressed by a dominant mechanism. *Cancer Res*, 64: 1951-1958

- **Haitel, A.**; Wiener, H.G.; Baethge, U.; Marberger, M.; Susani, M. (2000): Mdm2 expression as a prognostic indicator in clear cell renal cell carcinoma: comparison with p53 overexpression and clinicopathological parameters. Clin Cancer Res, 6: 1840-1844
- **Harris, C.C.** (1996): Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: Clues for rational cancer therapeutic strategies. J Natl Cancer Inst, 88: 1442-1455
- **Harris, S.L.**; Gil, G.; Robins, H.; Hu, W.; Hirshfield, K.; Bond, E.; Bond, G.; Levine, A.J. (2005): Detection of functional single-nucleotide polymorphisms that affect apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA, 102: 16297-16302
- **Hirata, H.**; Hinoda, Y.; Kikuno, N.; Kawamoto, K.; Suehiro, Y.; Tanaka, Y.; Dahiya, R. (2007): MDM2 SNP309 polymorphism as risk factor for susceptibility and poor prognosis in renal cell carcinoma. Clin Cancer Res, 13: 4123-4129
- **Hofmockel, G.**; Wittmann, A.; Dammrich, J.; Bassukas, I.D. (1996): Expression of p53 and bcl-2 in primary locally confined renal cell carcinomas: no evidence for prognostic significance. Anticancer Res, 16: 3807-3811
- **Hong, Y.**; Miao, X.; Zhang, X.; et al. (2005): The role of P53 and MDM2 polymorphisms in the risk of esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Res, 65: 9582-9587
- **Hu, W.**; Feng, Z.; Ma, L.; Wagner, J.; Rice, J.J.; Stolovitzky, G.; Levine, A.J. (2007): A Single Nucleotide Polymorphism in the MDM2 Gene Disrupts the Oscillation of p53 and MDM2 Levels in Cells. Cancer Res, 67: 2757-2765
- **Jemal, A.**; Siegal, R.; Ward, E.; Murray, T.; Xu, J.; Smigal, C. et al. (2006): Cancer statistics. CA Cancer J Clin, 56: 106
- **Khan, S.**; Abdelrahim, M.; Samudio, I.; Safe, S. (2003): Estrogen receptor/Sp1 complexes are required for induction of cad gene expression by 17h-estradiol in breast cancer cells. Endocrinology, 144: 2325-2335
- **Kinyamu, H.K.**; Archer, T.K. (2003): Estrogen receptor-dependent proteasomal degradation of the glucocorticoid receptor is coupled to an increase in MDM2 protein expression. Mol Cell Biol, 23: 5867-5881
- **Knight, D.A.**; Stadler, W.M. (2007): Prognostic factors in localized renal cell cancer. BJU Int, 99: 1212-1216

- **Knudson, A.G. (1971):** Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 68: 820-823
- **Kosary, C.L.; McLaughlin, J.K. (1993):** Kidney and renal pelvis. In: *Cancer Statistics Review: 1973-1990*. National Institutes of Health Publication No. 93-2789, XI-X22
- **Kreiger, N.; Marrett, L.D.; Dodds, L.; Hilditch, S.; Darlington, G.A. (1993):** Risk factors for renal cell carcinoma: results of a population-based case-control study. *Cancer Causes Control*, 4: 101-110
- **Kulozik, A.E.; Hentze, M.W.; Hagemeyer, C.; Bartram, C.R. (2000):** Molekulare Medizin. De Gruyter Verlag, Berlin, New York, pp. 174-197
- **Laber, D.A. (2006):** Risk factors, classification, and staging of renal cell cancer. *Medical Oncology*, 23: 443-454
- **Lambe, M.; Lindblad, P.; Wu, J.; Remler, R.; Hsieh, C.C. (2002):** Pregnancy and risk of renal cell cancer: a population-based study in Sweden. *Br J Cancer*, 86:1425-1429
- **Lane, D.P. (1992):** Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358: 15-16
- **Lee, F.; Patel, H.R. (2002):** Kidney cancer: current management guidelines. *Hosp Med*, 63: 214-217
- **Lind, H.; Zienolddiny, S.; Ekstrom, P.O.; Skauq, V.; Haugen, A. (2006):** Association of a functional polymorphism in the promoter of the MDM2 gene with risk of non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*, 119: 718-721
- **Lipworth, L.; Tarone, R.E.; McLaughlin, J.K. (2006):** The epidemiology of renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*, 176: 2353-2358
- **Liu, G.; Wheatley-Price, P.; Zhou, W.; Park, S.; Heist, R.S.; Asomaning, K.; Wain, J.C.; Lynch, T.J.; Su, L.; Christiani, D.C. (2008):** Genetic polymorphisms of MDM2, cumulative cigarette smoking and nonsmall cell lung cancer risk. *Int J Cancer*, 122: 915-918
- **Mathew, A.; Devesa, S.S.; Fraumeni, J.F., Jr.; Chow, W.H. (2002):** Global increases in kidney cancer incidence, 1973-1992. *Eur J Cancer Prev*, 11: 171
- **Menin, C.; Scaini, M.C.; De Salvo, G.L.; et al. (2006):** Association between MDM2-SNP309 and age at colorectal cancer diagnosis according to p53 mutation status. *J Natl Cancer Inst*, 98: 285-288
- **Millikan, R.C.; Heard, K.; Winkel, S.; Hill, E.J.; Heard, K.; Massa, B.; Mayes, L.; Williams, P.; Holston, R.; Conway, K.; Edmiston, S.; de Cotret, A.R. (2006):**

No association between the MDM2-309 T/G promoter polymorphism and breast cancer in African-Americans or Whites. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15: 175-177

- **Moch, H.**; Sauter, G.; Gasser, T.C.; Buchholz, N.; Bubendorf, L.; Richter, J.; Jiang, F.; Dellas, A.; Mihatsch, M.J. (1997): P53 protein expression but not mdm-2 protein expression is associated with rapid tumor cell proliferation and prognosis in renal cell carcinoma. *Urol Res*, 25: 25-30
- **Moll, U.M.**; Petrenko, O. (2003): The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res*, 1: 1001-1008
- **Negri, E.**; Foschi, R.; Talamini, R.; Montella, M.; Ramazzotti, V.; Dal Maso, L.; Bosetti, C.; Franceschi, S.; Zucchetto, A.; La Vecchia, C. (2006): Family history of cancer and the risk of renal cell cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15: 2441-2444
- **Ohmiya, N.**; Taguchi, A.; Mabuchi, N.; et al. (2006): MDM2 promoter polymorphism is associated with both an increased susceptibility to gastric carcinoma and poor prognosis. *J Clin Oncol*, 20: 4434-4440
- **Onel, K.**; Cordon-Cardo, C. (2004): MDM2 and prognosis. *Mol Cancer Res*, 2: 1-8.
- **Osborne, C.K.** (1998): Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat*, 51: 227-238
- **Phelps, M.**; Darley, M.; Primrose, J.N.; Blaydes, J.P. (2003): P53-independent activation of the hdm2-2 promoter through multiple transcription factor response elements results in elevated hdm2 expression in estrogen receptor a-positive breast cancer cells. *Cancer Res*, 63: 2616-2623
- **Pine, S.R.**; Mechanic, L.E.; Bowman, E.D.; Welsh, J.A.; Chanock, S.C.; Shields, P.G.; Harris, CC. (2006): MDM2 SNP309 and SNP354 are not associated with lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15: 1559-1561
- **Pomer, S.**; Staehler, G. (1997): Nierentumoren. Springer-Verlag, Berlin, 1. Aufl., pp. 21-49
- **Poremba, C.**; Bankfalvi, A.; Dockhorn-Dworniczak, B. (1996): Das Tumorsuppressorgen p53. *Pathologe*, 17: 181-188

- **Poston, C.D.** et al. (1995): Characterization of the renal pathology of a familial form of renal cell carcinoma associated with von Hippel-Lindau disease. *J Urol*, 153: 22-26
- **Ries, S.**; Biederer, C.; Woods, D.; et al. (2000): Opposing effects of RAS on p53: transcriptional activation of mdm2 and induction of p19ARF. *Cell*, 103: 321-330
- **Risch, N.** (2001): The genetic epidemiology of cancer: interpreting family and twin studies and their implications for molecular genetic approaches. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10: 733–741
- **Risch, N.J.** (2000): Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*, 405: 847–856
- **Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg) (2008):** Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends, 6. Auflage; Berlin
- **Ruijs, M.W.G.**; Schmidt, M.K.; Nevanlinna, H.; Tommiska, J.; Aittomäki, K.; Pruntel, R.; Verhoef, S.; van't Veer, L.J. (2007): The single-nucleotide polymorphism 309 in the MDM2 gene contributes to the Li-Fraumeni syndrome and related phenotypes. *Eur J Hum Genet*, 15: 110-114
- **Sejima, T.**; Miyagawa, I. (1999): Expression of bcl-2, p53 oncoprotein, and proliferating cell nuclear antigen in renal cell carcinoma. *Eur Urol*, 35: 242–248
- **Sorbellini, M.**; Kattan, M.W.; Snyder, M.E.; et al. (2005): A postoperative nomogram predicting recurrence for patients with conventional clear cell renal cell carcinoma. *J Urol*, 173: 48–51
- **Sotamaa, K.**; Liyanarachchi, S.; Mecklin, J.P.; Järvinen, H.; Aaltonen, L.A.; Peltomäki, P.; de la Chapelle, A. (2005): p53 codon 72 and MDM2 SNP309 polymorphisms and age of colorectal cancer onset in Lynch syndrome. *Clin Cancer Res*, 11: 6840-6844
- **Störkel, S.** (1999): Epitheliale Tumoren der Niere – Pathologische Subtypisierung und zytogenetische Korrelation. *Der Urologe*, 38: 425-432
- **Störkel, S.**; Steart, P.V.; Drenckhahn, D.; Thoenes, W. (1989): The human chromophobe cell renal carcinoma: Its probable relation to intercalated cells of the collecting duct. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 56: 237-245
- **Stryer, L.**; Berg, J.M.; Tymoczko, J.L. (2003): Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, 5. Aufl., pp.160-168

- **Sullivan, A.;** Syed, N.; Gasco, M.; Bergamachi, D.; Trigiante, G.; Attard, M.; Hiller, L.; Farrell, P.J.; Smith, P.; Lu, X.; Crook, T. **(2004):** Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene*, 23: 3328-3337
- **Swinney, R.M.;** Hsu, S.C.; Hirschman, B.A.; Chen, T.T.; Tomlinson, G.E. **(2005).** MDM2 promoter variation and age of diagnosis of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 19: 1996-1998
- **Thomas, M.;** Kalita, A.; Labrecque, S.; Pim, D.; Banks, L.; Matlashewski, G. **(1999):** Two polymorphic variants of wildtype p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol*, 19: 1092-1100
- **Tomasino, R.M.;** Morello, V.; Tralongo, V.; et al. **(1994):** p53 expression in human renal cell carcinoma: an immunohistochemical study and a literature outline of the cytogenetic characterization. *Pathologica*, 86: 227-33
- **Tsui, K.H.;** Shvarts, O.; Smith, R.B.; Figlin, R.A.; deKernion, J.B.; Belldegrun, A. **(2000):** Prognostic indicators for renal cell carcinoma: a multivariate analysis of 643 patients using the revised 1997 TNM staging criteria. *J Urol*, 163: 1090–1095
- **Uchida, T.;** Gao, J.; Wang, C.; Jiang, S.; Muramoto, M.; Satoh, T.; Minei, S.; Shimura, S.; Irie, A.; Kameya, T.; Baba, S. **(2002):** Clinical significance of p53, mdm2, and bcl-2 proteins in renal cell carcinoma. *Urology*, 59: 615-620
- **Vaishampayan, U.N.;** Do, H.; Hussain, M. et al. **(2003):** Racial disparity in incidence patterns and outcome of kidney cancer. *Urology*, 62: 1012-1017
- **Venter, J.C.;** Adams, M.D.; Myers, E.W.; et al. **(2001):** The sequence of the human genome. *Science*, 291:1304-1351
- **Vogelzang, N.J.;** Stadler, W.M. **(1998):** Kidney cancer. *Lancet*, 352: 1691-1696
- **Weinberg, R.A. (2007):** The Biology of Cancer. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, New York, pp. 307-328
- **Wilkening, S.;** Bermejo, J.L.; Hemminki, K. **(2007):** MDM2 SNP309 and cancer risk: a combined analysis. *Carcinogenesis*, 28: 2262-2267
- **Wirth, M.P. (1993):** Immunotherapy for metastatic renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am*, 20: 283-295
- **Wittekind, C. (Hrsg.) (2002):** UICC-TNM Klassifikation maligner Tumore. Springer-Verlag, Berlin, 6. Aufl., pp. 181-183

- **Yang, J.C.;** Haworth, L.; Sherry, R.M.; et al. **(2003)**: A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. N Engl J Med, 349: 427-434
- **Zigeuner, R.;** Ratschek, M.; Rehak, P.; Schips, L.; Langner, C. **(2004)**: Value of p53 as a prognostic marker in histologic subtypes of renal cell carcinoma: a systematic analysis of primary and metastatic tumor tissue. Urology, 63: 651-655

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

5-JÜR	5-Jahres-Überlebensrate
Abb.	Abbildung
ad	zu
AJCC	American Joint Committee in cancer
Arg	Arginin
ATM	Ataxia-Telangiectasia mutated
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaar
CC	hellzellig
CP	chromophob
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere
G 1-3	Differenzierungsgrad 1-3
G	Guanin
HE	Hämatoxylin-Eosin
IL2	Interleukin-2
kb	Kilobasen
LFS	Li-Fraumeni-Syndrom
Lk	Lymphknoten
MDM2	Mouse double minutes 2

MSPA	Moraxella species Restriktionsenzym
n	Anzahl
NZK	Nierenzellkarzinom
PAP	Papillär
PCR	Polymerase chain reaction
Pro	Prolin
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
rpm	Rounds per minute
SNP	Single-Nucleotide Polymorphism
SP1	Stimulatory protein 1
SPSS	Statistical package for the social sciences
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TNM	Tumour, Node, Metastasis
TSG	Tumorsuppressogen
U	Unit
UICC	Union internationale contre le cancer
UK	United Kingdom
UV	ultraviolet
V	Volt
V.	Vena
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHL	Von-Hippel-Lindau
WHO	World Health Organisation

8.2 Danksagung

Den Einstieg in die klinische und wissenschaftliche Forschung zu finden und eine Dissertation zu verfassen, ist nur durch die Unterstützung und Hilfe verschiedener Personen möglich. Daher möchte ich zunächst Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter danken, dass ich an seinem Institut für Pathologie der Universität Regensburg meine Dissertation anfertigen konnte. Ich danke Prof. Dr. Arndt Hartmann für die Bereitstellung meines Dissertationsthemas und für die sehr gute und zuverlässige Betreuung als Doktorvater trotz Standortwechsels an das Institut für Pathologie der Universität Erlangen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Christine Hammerschmied für die hervorragende, zuverlässige und freundschaftliche Betreuung meiner Arbeit. Ihre Unterstützung bei Labortätigkeiten und bei der statistischen Auswertung meiner Daten sowie ihre Beratung während des Schreibens haben zum erfolgreichen Gelingen meiner Dissertation beigetragen. In vielen interessanten Gesprächen hat sie mir Motivation, Spaß und Freude an der Forschung vermittelt.

Außerdem danke ich Dr. rer. nat. Robert Stoehr, der mir ebenfalls in vielen Fragen bereitwillig geholfen hat, und Florian Hitzenbichler für die Bereitstellung der Daten der Kontrollgruppe.

Ohne die Einarbeitung und Unterstützung durch Labormitarbeiter ist die Durchführung einer Forschungstätigkeit kaum möglich. Daher danke ich vor allem den Medizinisch-technischen Assistentinnen Nina Nießl und Kerstin Reher ganz herzlich für ihre Hilfe. Ebenfalls danke ich Simone Planke, Monika Kerscher, Sigrun Ammon, Stefanie Götz und Kerstin Meier.

Dem Schreiben einer Doktorarbeit geht eine eingehende Literaturrecherche voraus. Bei dieser habe ich dankenswerterweise wertvolle Unterstützung von Dr. Helge Knüttel (Leiter der Teilbibliothek Medizin) erhalten.

Schließlich bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mich während des Studiums und des Verfassens der Dissertation sehr unterstützt haben und konstantes Interesse an meinem Werdegang und meiner Arbeit zeigen. Meinem Vater danke ich auch für die orthographische Korrektur meiner Arbeit.

8.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Antonia Sophie Wenners
Geburtsdatum/ -ort: 21. September 1983, Kiel
Staatsangehörigkeit: Deutsch



Schul Ausbildung

1990 - 1994 Grundschule Mönkeberg, Schleswig-Holstein
1994 - 2003 Heinrich-Heine-Gymnasium Heikendorf, Schleswig-Holstein;
Abitur
08 - 12 / 2000 George Watson's College Edinburgh, Schottland,
Großbritannien

Hochschulausbildung

10 / 2003 - 10 / 2005 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-
Universität zu Kiel; Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10 / 2005 – 11 / 2009 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg;
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

09 / 2005 Lubinus-Klinik Kiel, Abteilung für Wirbelsäulenchirurgie
02 - 03 / 2006 Universitätsklinikum Regensburg, Klinik für Innere Medizin I
08 - 09 / 2006 Praxis „Frauenärzte Prüner Gang“ Kiel
02 - 04 / 2007 F. Tappeiner Krankenhaus Meran, Italien, Abteilung für
Gynäkologie und Geburtshilfe
03 - 04 / 2008 Klinikum Prenzlauer Berg Berlin, Klinik für Anästhesie,
Intensivmedizin und Schmerztherapie

Praktisches Jahr

08 - 09 / 2008 Universitätsklinikum Regensburg, Klinik für Innere Medizin II
09 - 12 / 2008 University of California, San Diego, USA, Department of
Medicine
12 / 2008 - 04 / 2009 Caritas-Krankenhaus St. Josef, Klinik für Frauenheilkunde
und Geburtshilfe der Universität Regensburg
04 - 07 / 2009 Universitätsklinikum Regensburg, Klinik für Chirurgie